

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

**Eine intravenöse Studie, um den Effekt auf die Osseointegration von
Metallimplantaten im Tiermodell der Ratte zu testen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Maren Stempel-Estelmann

Tierärztin
Bad Bergzabern, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. Dr. Stephen Ferguson, Korreferent

Zürich 2015

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

**Eine intravenöse Studie, um den Effekt auf die Osseointegration
von Metallimplantaten im Tiermodell der Ratte zu testen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Maren Stempel-Estelmann

Tierärztin
Bad Bergzabern, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. Dr. Stephen Ferguson, Korreferent

Zürich 2015

Zusammenfassung.....	1
Summary	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Zielsetzung der Arbeit	3
1.2 Literaturübersicht	3
1.2.1 Die Ratte als Versuchstier	3
1.2.2 Osseointegration von Titanimplantaten.....	4
1.2.3 Bone remodeling	6
1.2.4 Einfluss von Medikamenten auf die Knochenneubildung.....	6
2 Material und Methoden	11
2.1 Aufbau der Studie.....	11
2.1 Tiermangement	12
2.2 Injektionen	13
2.2.1 ACTRIIB-AK:.....	13
2.2.2 Placebo.....	13
2.2.3 Ablauf der Injektionen	14
2.3 Implantat	15
2.4 Anästhesie	16
2.5 Identifizierung der Tiere.....	16
2.6 Operation	16
2.6.1 Operationsvorbereitung.....	16
2.6.2 Chirurgischer Eingriff	17
2.6.3 Postoperatives Management	18
2.7 Analgesie.....	18
2.8 Probengewinnung und Aufbereitung	19
2.9 Makroskopische und mikroradiologische Evaluation	20
2.10 MicroCT –Technik	20

2.11	Histologische Evaluation.....	22
2.12	Qualitative und quantitative histologische Auswertung	23
2.13	Biomechanische Testung	24
2.14	Serum: Bioanalytische Methode.....	26
2.15	Statistik.....	27
<hr/>		
3	Resultate.....	28
3.1	Tiermanagement.....	28
3.1.1	Tierhaltung	28
3.1.2	Körpergewicht	28
3.1.3	Sentineluntersuchung	29
3.2	Injektionen.....	29
3.3	Anästhesie/ Operation	29
3.4	Postoperatives Management.....	29
3.5	Resultate der post mortem Untersuchungen	30
3.5.1	Probengewinnung und Aufbereitung.....	30
3.5.2	Röntgenbilder der Kochen	30
3.5.3	Mikroradiographien.....	30
3.5.4	µCT	30
3.5.5	Histologie.....	31
3.5.6	Biomechanische Testung	32
3.6	Serumanalyse	34
<hr/>		
4	Diskussion	35
4.1	Ziel der Studie.....	35
4.2	Tiermodell Ratte	35
4.1	Titan als verwendetes Implantatmaterial	35
4.2	ActRIIB-AK.....	36
4.3	Radiologische Auswertung.....	37
4.3.1	Mikroradiographien.....	37

4.3.2	μCT-Analyse.....	38
4.4	Histologische Auswertung.....	38
4.5	Biomechanische Testung	39
4.6	Serumanalyse.....	39
4.7	Schlussfolgerung.....	40
<hr/>		
5	Literaturverzeichnis.....	41
	Abkürzungsverzeichnis	46
6	Anhang	48
6.1	Tabellen	48
6.2	Abbildungen.....	62
6.2.1	Körpergewicht.....	62
6.2.2	Körpergewichtszunahme in der Lebendphase.....	65
6.2.3	BIC-Beispiel.....	65
<hr/>		
	Danksagung.....	
	Lebenslauf	

Zusammenfassung

Das Ziel der Studie war es, die Effekte von intravenös (iv) verabreichtem ActRIIB-AK auf die Osseointegration von Titanimplantaten im Vergleich zu einer Placebogruppe zu evaluieren. 61 männliche Ratten wurden nach dem Zufallsprinzip in 3 Gruppen zu je 20 (Gruppe 3 : 21) Tieren eingeteilt. Den Ratten wurde entweder das ActRIIB-AK oder das Placebo in verschiedenen Dosierungsschemata verabreicht. Bei allen Ratten wurde eine Titanschraube in die linke Tibia implantiert. Nach 28 Tagen wurden die Ratten euthanasiert. Alle Tibiae wurden makroskopisch und radiologisch beurteilt. Davon wurden 31 zusätzlich biomechanisch und die anderen 30 zusätzlich im μ CT untersucht. Die Evaluierung des Knochen-Implantat-Kontakts (BIC) und die biomechanische Testung zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Im μ CT war lediglich zwischen den Gruppen ein Unterschied in der Anzahl und der Separation der Knochenbälkchen zu erkennen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die iv Applikation von ActRIIB-AK eine signifikant grössere postoperative Gewichtszunahme der Ratten zur Folge hatte als die der Kontrollgruppe. Die biomechanischen Eigenschaften des Knochens ändern sich jedoch nicht. Es konnten keine Auswirkungen auf die Osseointegration einer Titanschraube in der Rattentibia aufgezeigt werden. Es wurden keine klinischen Nebenwirkungen von ActRIIB-AK bemerkt.

Summary

The aim of the study was to evaluate potential effects of intravenously given ActRIIB-AK on osseointegration of titanium implants into rat tibiae compared to placebo. 61 male rats were randomly allocated in 3 groups of each 20 animals (group 3 : 21). The rats received the injections in different dosages schedules. A titanium screw was implanted into the left tibia shaft. After 28 days the animals were sacrificed. All tibiae were evaluated macroscopically and radiologically, 31 bones were additionally tested biomechanically and 30 additionally by μ CT, microradiography and histologically. The relative bone-implant-contact and the biomechanical testing revealed no significant differences between the three groups. As a side effect it was observed that the animals treated with the test item gained significantly more weight than the animals that were treated with the placebo. The μ CT analysis showed significant differences between groups only for the comparison concerning trabecular separation and trabecular number. In conclusion it can be stated that the intravenous injection of ActRIIB-AK had a significant effect on post-surgical weight gain compared to controls. No adverse influence on the mechanical properties of the bone or the osseointegration of an implanted screw was observed. No ActRIIB-AK -related clinical signs were noted.

1 Einleitung

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine in vivo Untersuchung bei der ein Fusionsprotein aus einem Antikörper und der extrazellulären Domäne eines Aktivinrezeptors IIB (ActRIIB) intravenös appliziert wurde (ActRIIB-Fc). Dieses ActRIIB-Fc-Fusionsprotein wird im folgenden als ActRIIB-AK bezeichnet. Als Tiermodell diente die Ratte.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Studie war es, die Effekte des intravenös injizierten Test Items ActRIIB-AK in zwei Dosierungen auf die Osseointegration eines metallischen Implantates auszuwerten. Zum Vergleich dienten Tiere einer Kontrollgruppe, denen ein Placebo appliziert wurde.

ActRIIB-AK ist ein Fusionsprotein, das die Signaltransduktion durch den Aktivinrezeptor IIB beeinflusst. Es wurde vermutet, dass Aktivinantagonisten positive Auswirkungen auf die Knochenneubildung haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten eine Aussage über den Einfluss dieses Aktivinantagonisten auf die Osseointegration von Implantaten und mögliche Nebenwirkungen des Medikamentes erlauben.

1.2 Literaturübersicht

1.2.1 Die Ratte als Versuchstier

Die Ratte als Versuchstier in der Knochenforschung wurde schon in den 1940er Jahren etabliert [1], und in grosser Zahl verwendet [2-7]. Die Verfügbarkeit hoher Tierzahlen, günstige Haltungsbedingungen, unkomplizierten Narkosen und Operationen sowie die geringen interindividuellen Unterschiede machen die Ratte zu einem bevorzugten Versuchstier [8].

Der verbreitete Einsatz von Ratten in der Forschung führte zu einer Vielzahl von Knochenheilungsmodellen, verbunden mit einer umfassenden Kenntnis über den Knochenstoffwechsel dieser Tiere [2-7].

So scheinen die Geschlechtshormone einen bedeutenden Einfluss auf den Knochenmetabolismus zu haben [9]. Verschiedene Studien zeigen, dass es deutliche Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren bezüglich ihrer Knochenheilung gibt. Weibliche Ratten zeigen weniger mesenchymale Stammzellen im Knochenmark, eine geringere Osseointegration [10] und eine langsamere Knochenheilung im Vergleich zu männlichen Ratten [11]. Zusätzlich sollte beachtet werden, dass bei männlichen Ratten durch ihr meist höheres Körpergewicht eine andere Belastung und dadurch auch andere Heilungsbedingungen herrschen [8].

Nager zeigen einen anderen Mechanismus des Knochenumbaus als grössere Säugetiere und auch als der Mensch. Sie besitzen eine primitive Knochenstruktur ohne das bei anderen Säugetieren und auch beim Menschen vorhandene Havers'sche System. Nager nutzen sogenannte Resorptionshöhlen für den Knochenumbau, die denen des Havers'schen Systems sehr ähneln. Somit schliesst dieser Unterschied die Ratte als Versuchstier in der Forschung der Osseointegration und des Knochenumbaus nicht aus [15].

1.2.2 Osseointegration von Titanimplantaten

Brånemark beschreibt die Osseointegration als den unter dem Lichtmikroskop zu sehenden, direkten strukturellen und funktionellen Verbund zwischen der Oberfläche des belasteten Implantats und dem organisierten umgebenden vitalen Knochengewebe. Seit diesen Untersuchungen ist bekannt, dass ein Titanimplantat nach Insertion in Ratten und Kaninchen nach einem Monat so mit dem Knochen verwachsen ist, dass man es ohne Beschädigung des umliegenden Knochens nicht mehr entfernen kann [6, 16]. Die Prozesse an der Implantat-Knochengrenze ähneln dabei denen der Frakturheilung [17]. Es zeigte sich, dass bei der Ratte nach einem Monat eine nahezu vollständige Osseointegration stattgefunden hat, wobei es weder zu signifikanten Entzündungsreaktionen noch zur Bildung fibröser Gewebe kam [2, 7].

Die Gewebeantwort nach Einsetzen eines Titanimplantats kann man in fünf Phasen einteilen: Entzündungsphase; Anfangsphase der Knochenneubildung; Pseudoosseointegrationsphase; Phase, in der der Geflechtknochen ersetzt wird, und finale Phase der Osseointegration [7]. Es kommt also zunächst zu einer Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen, danach folgt die Resorption des geschädigten Knochens durch Osteoklasten und anschliessend beginnen Osteoblasten mit der Knochenneubildung. In einem Titan-Implantations-Modell an der Maxilla der Ratte waren nach Zahnextraktion die leeren Zahnalveolen nach einem Monat komplett mit neuem Knochen aufgefüllt, welcher makroskopisch nicht vom alten Knochen zu unterscheiden war. Das bedeutet, dass die ersten vier Wochen nach Implantation als kritische Phase bezüglich der Osseointegration angesehen werden können [2, 5, 18]. Um eine ausreichende Osseointegration zu erreichen, muss sich der neugebildete Knochen möglichst ohne Zwischenraum an das Implantat anlagern. Dies ist zum einen von biologischen Voraussetzungen abhängig wie Art und Gesundheit des Knochens, im Tierversuch von der Tierart, dem Geschlecht und dem Alter des Versuchstieres [11, 19]. Zum anderen spielen die Eigenschaften des Implantats, wie Material und Oberflächenbeschaffenheit, die Belastung des Implantats im Knochen und der Abstand zwischen Knochen und Implantat eine grosse Rolle [3, 4, 8, 18].

Die Osseointegration kann neben qualitativer Evaluation auch semi-quantitativ und quantitativ durch verschiedene Untersuchungsmethoden evaluiert werden. Die semi-quantitative Beurteilung kann lichtmikroskopisch durch Zählen von Entzündungszellen in einem definierten Bereich um das Implantat erfolgen. Die Zellzahl ist ein häufig verwendeter Parameter, um die Biokompatibilität des eingesetzten Materials zu testen [2, 17, 20]. Als quantitative Untersuchungsmethode hat sich in der Histologie neben der Immunhistologie auch die Messung des Bone-implant-contacts (BIC) etabliert [21, 22].

Ein weiteres quantitatives Verfahren ist neben der μ CT-Analyse [9, 23] auch die biomechanische Testung. Zum einen nichtdestruktive biomechanische

Testverfahren wie Resonanzfrequenzanalysen und der Periotest®, zum anderen auch destruktive Tests wie Pull out und Torque Test [14, 24]. Speziell um die Verbindung zwischen Implantat und Knochen (Interface) zu testen, kann neben dem Pullout Test der Torque Test durchgeführt werden. Der Torque Test ist besonders gut geeignet, da hierbei über das Drehmomentverhalten der Implantate deren Verankerung im Knochen untersucht wird. Das Ausdrehmoment und die „Interfacial Stiffness“ werden in der Biomechanik als Beschreibung für die Güte der Osseointegration herangezogen [5, 25-28].

Zahlreiche Studien haben die ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit und biophysikalischen Eigenschaften von Titan bewiesen [2-4, 6, 7, 18]. Deshalb hat sich Titan als Implantatwerkstoff sowohl in der Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde, als auch in der Orthopädie bewährt [20, 29, 30].

1.2.3 Bone remodeling

Knochenumbau oder „Bone remodeling“ bezeichnet das Zusammenspiel von knochenresorbierenden Osteoklasten und knochenbildenden Osteoblasten, welches durch Hormone und Wachstumsfaktoren gesteuert wird [31, 32].

Eine Störung dieses Zusammenspiels ist häufig die Ursache von Knochenerkrankungen wie Osteoporose oder tumorinduziertem Knochenschwund [33-35]. Das legt die Vermutung nahe, dass durch eine gezielte Beeinflussung dieser Zellen die Knochenheilung und die Qualität des neugebauten Knochens gesteigert oder vermindert werden kann [35, 36].

1.2.4 Einfluss von Medikamenten auf die Knochenneubildung

Bis jetzt gibt es zwei Gruppen von Medikamenten, welche die Knochenneubildung steigern sollen: zum einen antiresorptive Medikamente, die durch Hemmung der Osteoklastenaktivität den Knochenabbau reduzieren [37] und zum anderen anabol wirkende Medikamente, die durch Anregen der Osteoblasten eine Steigerung der Knochenneubildung und somit eine höhere Knochenstärke und Knochenmasse bewirken [38]. Nachteil der antiresorptiven Medikamente ist, dass Osteoklasten

nicht nur Knochen abbauen, sondern eine wichtige Rolle im Knochenumbau und in der Knochenreparatur spielen. So sind sie massgeblich an der Reparatur von Mikroläsionen beteiligt, welche bei täglicher Belastung entstehen. Hemmt man also dauerhaft die Osteoklastenaktivität, werden diese Prozesse unterbrochen, was wiederum zu einer Akkumulation von Mikroläsionen und einer Schwächung der Knochenstruktur führen kann [39]. Antiresorptive Medikamente vermindern zwar den Knochenabbau, tragen aber nicht zu einer vermehrten Knochenneubildung bei [40, 41]. Anabol wirkende Medikamente bewirken dagegen durch Anregen der Osteoblasten eine Steigerung der Knochenneubildung, allerdings gibt es zum jetzigen Zeitpunkt nur ein von der FDA zugelassenes Medikament in dieser Gruppe, das Parathyroidhormon (PTH), welches entweder als 1-34 Fragment von rekombinantem humanen PTH oder als Teriparatid verabreicht wird [42]. Grosse Nachteile von Teriparatid sind zum einen die limitierte Anwendungsdauer von 24 Monaten (USA) bzw. 18 Monaten (Europa) und diverse Nebenwirkungen, die auftreten können [38, 42, 43].

1.2.4.1 Transforming Growth Factors

Vergangene Studien haben sich vermehrt mit Aktivin, einem Mitglied der Transforming-Growth-Factor-Familie, und mit dessen Hemmung durch entsprechende Antagonisten, wie z.B. Inhibin im Knochenstoffwechsel beschäftigt [44]. Die Superfamilie der Transforming Growth Factors (TGF) übernimmt verschiedenste Aufgaben in der Immunantwort. Transforming Growth Factors regulieren die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben von Lymphozyten. Zusätzlich kontrollieren sie die Regulation und Aktivierung natürlicher Killerzellen, dendritischer Zellen, Makrophagen, Mastzellen und Granulozyten [45]. Ausserdem spielen sie eine wichtige Rolle beim neuronalen Wachstum und auch im Knochenstoffwechsel. Sie werden lokal in der Knochenmatrix produziert und sammeln sich dort an. Stimulierte Osteoklasten

setzen im Rahmen der Knochenresorption TGFs frei, diese wiederum aktivieren Osteoblasten und fördern somit den Knochenneubau. [46-48].

1.2.4.1.1 Inhibin

Inhibin ist ein Peptidhormon und Mitglied der TGF-beta Superfamilie. Es ist in der Lage an Typ II Aktivinrezeptoren zu binden, allerdings mit einer geringeren Affinität als Aktivin selbst. Es handelt sich hierbei um eine kompetitive Bindung, wobei Inhibin den Rezeptor für Aktivin blockiert und somit als natürlicher Antagonist agiert [49, 50].

1.2.4.1.2 Aktivin

Aktivin ist ebenfalls ein Mitglied dieser Superfamilie und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Knochenstoffwechsels [51, 52]. Seine Signaltransduktion findet über zwei Rezeptortypen statt: Aktivinrezeptor IIA (ActIIA) und Aktivinrezeptor IIB (ActIIB). Diese Rezeptoren sind primär ligandenbindende Rezeptoren für Aktivin und Myostatin [53, 54]. Die biologische Aktivität und die Art der Ligandenbindung dieser Rezeptoren wurden getestet, indem man eine isolierte Form der extrazellulären Domäne (ECD) des ActII-Rezeptors in einem Baculovirus-System exprimierte. Hierbei zeigte sich, dass ActRII-ECD ein funktionelles Protein ist, welches die Fähigkeit besitzt, sowohl Aktivin A als auch Inhibin A in unterschiedlicher Affinität zu binden [55].

Die Funktion von Aktivin bezogen auf den Knochenstoffwechsel ist noch unklar. Es ist allerdings einer der am häufigsten im Knochen vorkommenden TGFs [51]. Verschiedene Studien an Ratten zeigen, dass Aktivin die Osteoblastenaktivität und somit auch die Knochenneubildung positiv beeinflusst [53, 56, 57]. Zusätzlich stimuliert Aktivin die Osteoklastendifferenzierung und induziert in vitro Osteoklasten-ähnliche Zellen (Osteoclast-like cells, OCL) [58]. Neuere Studien zeigen allerdings, dass gerade die Hemmung von Aktivin einen positiven Effekt auf die Knochenneubildung haben kann [59]. Die induzierte Expression von Inhibin in

transgenen Mäusen führte zu einer signifikant höheren Knochenmasse und –stärke [60].

Ein weiterer Weg Aktivin zu antagonisieren, ist ein Fusionsprotein aus der ECD des ActRII Rezeptors und der Fc-Einheit eines Antikörpers (ActRII-Fc) zu bilden und dann zu applizieren [54]. Diese pharmakologische Blockade der Signaltransduktion des ActRII durch ein ActRIIA-Fc Fusionsprotein steigert die Knochenbildung, die Knochenmasse und Knochenstärke sowohl in gonadal intakten als auch in ovariectomierten Mäusen mit etabliertem Knochenschwund und hat somit nachweislich anabole Effekte auf den Knochen [14, 55]. Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Studie mit weiblichen Makaken, hierbei bewirkte die Applikation von ActRIIA-Fc eine deutliche Steigerung der Knochenmasse und Knochenstruktur [14, 61, 62]. Auch die Hemmung der Signaltransduktion über den ActRIIB Rezeptor, ebenfalls durch ein entsprechendes Fusionsprotein (ActRIIB-Fc), ändert die Knochenquantität und -qualität in Mäusen. Es wurde gezeigt, dass ActRIIB-Fc bei männlich kastrierten Mäusen mit Androgenmangel Muskelschwund, Fettakkumulation und Knochenschwund komplett verhindern kann [63]. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen über ActRIIA-Fc-behandelten Tiere, bei denen kein Einfluss auf das Muskelwachstum zu erkennen war. Das zeigt, dass ActRIIA und ActRIIB verschiedene Liganden binden. So bindet der ActRIIB anders als ActRIIA Myostatin, welches auch ein TGF und negativer Regulator der Muskelmasse ist. Durch die Behandlung mit ActRIIB-Fc blockiert man dessen Signaltransduktion und kann so in zwei Wochen die Muskelzunahme bei Mäusen um bis zu 60 % steigern [64].

Die systemische Applikation von ActRIIA-Fc führt nicht nur zu einer vermehrten Knochenneubildung, sondern auch durch eine reduzierte Osteoklastenanzahl zu einer verminderten Knochenresorption. Dies zeigt, dass die Hemmung von Aktivin sowohl einen anabolen als auch einen antiresorptiven Effekt hat und somit einer neuen Gruppe zugeteilt werden müsste [13, 61, 65].

Auf Grund dieser Ergebnisse sollte in der vorliegenden Studie der Effekt der Aktivinrezeptor IIB-Blockade auf die Osseointegration eines Implantates in die Tibia der Ratte untersucht werden.

Hypothese:

Die intravenöse Verabreichung von ACTRIIB-AK an Ratten hat einen positiven Einfluss auf die Osseointegration von Titanimplantaten.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbau der Studie

Die Studie wurde vom Kantonalen Veterinäramt Zürich mit der Bewilligungsnummer 230/2012 genehmigt und umfasst 61 männliche RCC Han Wistar Ratten im Alter von 6 - 12 Wochen (Harlan Laboratories, Venray, Niederlande). Die Ratten wurden nach dem Zufallsprinzip in 3 Gruppen zu je 20 (Gruppe 3: 21) Tieren eingeteilt. Die Ratten der Gruppe 5P (P: Placebo) und 5T (T: Test item) erhielten je 5 Injektionen, die der Gruppe 3T je 3 Injektionen. Bei den Tieren in Gruppe 5P und 5T mit 5 Injektionen wurde die erste Injektion am Tag vor der Operation durchgeführt. Dieser Tag wird im folgenden als Tag 1, der Tag der Operation als Tag 2 definiert (Tab. 1). Zunächst waren 60 Tiere geplant, eine Ratte verstarb acht Tage nach der Operation. Da sie zur Gruppe 3T (3 Injektionen ActRIIB-AK) gehörte, hatte sie zu diesem Zeitpunkt noch keine Injektion erhalten. Da es aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht erlaubt ist, eine Ratte alleine zu transportieren und zu halten, wurden zwei zusätzliche Ratten bestellt und operiert. Die zwei nachträglich operierten Ratten wurden der Gruppe 3T zugeteilt. Bei allen 61 Ratten wurde eine Titan-Schraube von medial in die linke Tibia implantiert. Von jeder Gruppe wurden je 10 der operierten Tibiae im μ CT und danach histologisch, die anderen 10 operierten Tibiae biomechanisch mit einem Torque Test untersucht. Von allen Tieren wurde vor der Euthanasie in Narkose aus der Jugularvene Blut entnommen, um die Konzentration der injizierten Substanz zum Zeitpunkt der Euthanasie zu messen.

Tab. 1: Gruppeneinteilung

Gruppe 1 5P	Placebo 5 Injektionen		Tag 1,8,15,22,29
Gruppe 2 5T	ActRIIB-AK 5 Injektionen	Dosis 100mg/kg	Tag 1,8,15,22,29
Gruppe 3 3T	ActRIIB-AK 3 Injektionen	Dosis 100mg/kg	Tag 15,22,29

2.1 Tiermangement

Die Tiere wurden 9 - 22 Tage vor der Operation von Harlan Laboratories (Harlan Laboratories B.V., Venray, Niederlande) angeliefert und im Biologischen Zentrallabor im Zentrum für klinische Forschung der Universitätsspitals Zürich in standardisierten, individuell belüfteten Käfigen (IVC T1500, Tecniplast, Hohenpeissenberg, Germany, oder IVC T2000, Allentown, NJ, USA) je nach Gewicht in Zweier- bis Vierergruppen eingestallt. Die Tiere wurden sowohl am Tag der Ankunft als auch am Tag der Operation einer allgemeinen klinischen Untersuchung unterzogen. Es wurden nur gesunde Tiere in den Versuch aufgenommen. Die Tiere wogen zum Zeitpunkt der Ankunft im Durchschnitt 337,24 Gramm (276-363 Gramm). Zur Identifizierung der Einzeltiere wurden alle Ratten mit Farbmarkierungen an den Schwänzen versehen. Während der Akklimatisationsphase wurde das Allgemeinbefinden der Tiere zweimal täglich, am Wochenende und an Feiertagen einmal täglich kontrolliert. Als Futter erhielten sie standardisiertes Alleinfuttermittel für Mäuse und Ratten (Alleinfuttermittel für Mäuse und Ratten M/R Haltung Extrudat, Provimi Kliba SA, Kaiseraugst, Schweiz). Futter und Wasser (konditioniertes Wasser der Stadt Zürich, Wasserdeseinfektion: ProMinent®, Regensdorf, Schweiz) wurden ad libitum zu Verfügung gestellt.

Am Tag der ersten Tierlieferung wurden drei zusätzliche Tiere mitgeliefert, die als Sentinels dienten. Es handelte sich auch hier um drei männliche, 10 - 12 Wochen

alte RCC Han Wistar Ratten, die unter den gleichen Bedingungen gehalten wurden wie die anderen Ratten der Studie. Dort blieben sie über die ganze Lebendphase der Studie unter Testkonditionen, wobei jede Woche eine kleine Menge Einstreu aus den zur Studie gehörenden Käfigen entnommen und in den Sentinelkäfig gestreut wurde (dirty bedding method [66]). Nachdem die Lebendphase beendet war, wurden die Sentinelratten lebend in ein Testinstitut (MicroBios, Reinach, Schweiz) verschickt und nach der Euthanasie dort mikrobiologisch untersucht

2.2 Injektionen

Das ActRIIB-AK und das Placebo wurden in die rechte oder linke laterale Schwanzvene injiziert.

2.2.1 ACTRIIB-AK:

Bei dem Test item handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der die Signaltransduktion des TGF Aktivin über seinen Rezeptor beeinflusst. Es wurde als Lyophilisat in Fläschchen mit je 150 mg ActRIIB-AK vom Sponsor geliefert und vor der Injektion gemäss den Herstellerangaben mit 1,5 ml einer 5 %igen Dextroselösung (Glucose 5 %, B.Braun Medical AG, Sempach, Deutschland) aufgelöst, so dass 100 mg ActRIIB-AK /ml enthalten waren. Es wurden 100 mg ActRIIB-AK /kg KGW, also 1ml gelöstes ActRIIB-AK pro kg KGW injiziert.

2.2.2 Placebo

Das Placebo wurde im Labor der MSRU nach den Angaben des Sponsors hergestellt. Es bestand aus 30 mM L-Histidin pH 6,0; 270 mM Sucrose; 51 mM Arginin und 0,06% Polysorbat 80 (w/v) um den stofflichen Eigenschaften von ActRIIB-AK so nahe wie möglich zu kommen. Die Lösung wurde angemischt und danach zweimal steril filtriert (Filter: Millipore, Millex GP, PES Membran, 0.2 µm Merck Millipores, Billerica, MA, USA). Das Placebo wurde aliquotiert (je 1,5 ml), in sterile Gefässe abgefüllt (Zentrifugentube, Corning CentriStar™, Corning, NY, USA) und anschliessend bei -20°C eingefroren. Am Tag der Injektion wurde die

benötigte Menge aufgetaut und vor der Injektion nochmals steril filtriert. Die Injektionsmenge entsprach der des ActRIIB-AK.

2.2.3 Ablauf der Injektionen

Für die Injektionen wurden die Ratten einzeln aus dem Käfig geholt, klinisch untersucht und in einem kleineren Käfig mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, um die Tiere anzuwärmen und damit die Gefäße zu dilatieren. Anschliessend wurden die Tiere in eine zur Injektion vorgesehene Fixiereinheit für Laborratten verbracht und fixiert (Abb. 1).

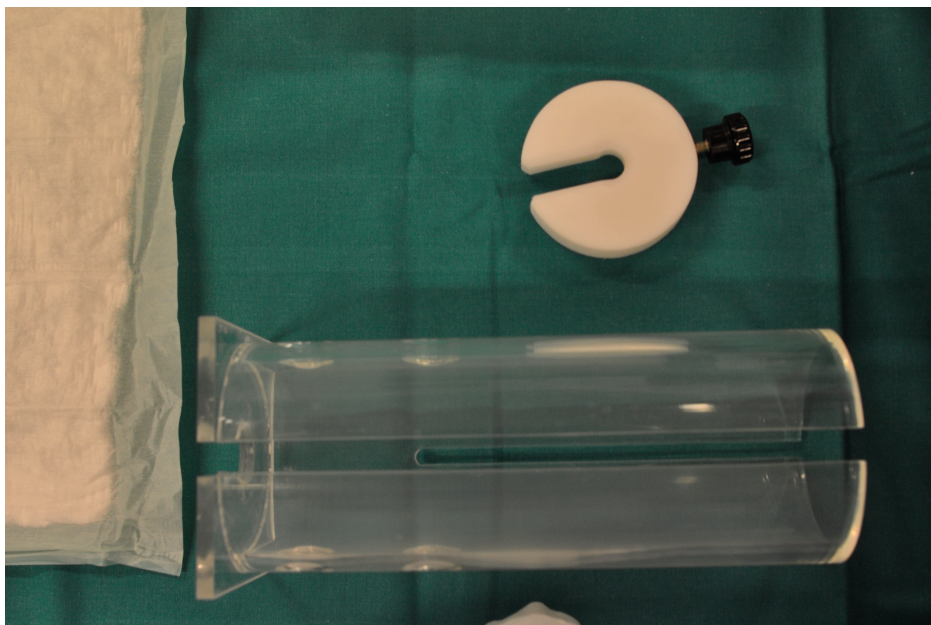


Abb. 1: Fixiereinheit für Ratten

Der Schwanz wurde durch Eintauchen in warmes Wasser weiter angewärmt, die Injektionsstelle mit 80 % Alkohol (Ethanol ketonisiert, Kantonsapotheke Zürich) desinfiziert und die laterale Schwanzvene wurde gestaut. Nach dem Identifizieren der Vene wurde das Test item bzw. das Placebo appliziert. Nach dem Entfernen der Injektionsnadel wurde die Injektionsstelle kurz komprimiert, um ein Nachbluten zu verhindern, anschliessend wurden die Ratten wieder in ihren Käfig zurückgesetzt.

2.3 Implantat

Bei den Schrauben handelte es sich um eine für dieses Projekt sonderangefertigte Reintitanschraube (Abb. 2) mit sandgestrahlter, säuregeätzter Oberfläche (INCELL®&APLIQUIQ® cp4 kalkverfestigt, Thommen Medical AG, Waldenburg, Schweiz) mit einem Kerndurchmesser von 1.1 mm, einem Gewindedurchmesser von 1.7 mm und einer Länge von 3 mm. Die Schrauben wurden direkt vor dem Implantieren mit einer Konditionierungsflüssigkeit (APLIQUI®, Thommen Medical AG, Waldenburg, Schweiz) benetzt und anschliessend implantiert. Danach wurde die Schutzkappe auf den Schraubenkopf aufgesetzt.



Abb. 2: Skizze der Schraube mit Transportfixierung

Bei der Konditionierungslösung handelt es sich um eine alkalische Lösung, die eine superhydrophile mikrorauhe Oberfläche schafft (0,05 M aqueous NaOH-Lösung). Die Schutzkappe aus Polyetheretherketon (PEEK) verhindert das Einwachsen von Weichteilgewebe in die Schraubenzieherrille des Schraubenkopfes.

2.4 Anästhesie

Die Ratten wurden einzeln in eine Narkosebox gesetzt, die mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch (5 %, Attane™, MINRAD INC., Buffalo, NY, USA in Sauerstoff, flow 800 ml/min) geflutet wurde. Nach Verlust des Stellreflexes wurde die Inhalationsnarkose über eine Gesichtsmaske mit Isofluran (2.0 – 3.90 %) in Sauerstoff (800 ml/min) fortgeführt. Die Analgesie wurde über eine Injektion von Ketamin erreicht (20 mg/kg KGW subcutan; Ketasol-100® Swissmedic, Bern, Schweiz). Um die Cornea vor dem Austrocknen zu schützen, wurde eine Augensalbe (Vitamin A Augensalbe, Bausch und Lomb Swiss AG, Zug, Schweiz) appliziert.

2.5 Identifizierung der Tiere

Neben den bei der Ankunft der Tiere angebrachten farbigen Schwanzmarkierungen wurden die Tiere zur unveränderlichen individuellen Kennzeichnung in Narkose zusätzlich mit einem subkutanen Transponder (Datamars®, Bedano, Schweiz) in der linken Flanke versehen. Hierfür wurde jede Ratte in der entsprechenden Region geschoren und der Chip wurde gemäss Herstelleranweisung implantiert. Jeder Chip wurde nach dem Einsetzen mit einem Chiplesegerät (MiniMax II Datamars®, Bedano, Schweiz) kontrolliert. Die Einstichstelle wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 3/0 Ethicon New Jersey, NY, USA) durch ein Einzelheft verschlossen. Die Markierungen am Schwanz wurden in Narkose und an den Tagen der i.v. Injektionen jeweils nachgefärbt.

2.6 Operation

2.6.1 Operationsvorbereitung

Das linke Hinterbein wurde vollständig geschoren (Schermaschine, Moser®, Unterkirnach, Germany) und mit einem alkoholischen Hautantiseptikum (Kodan®, Schülke & Meyer GmbH, Norderstedt, Deutschland) und 80 % Alkohol steril zur Operation vorbereitet. Um ein Auskühlen der Tiere während der Operation zu

vermeiden, wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte gelagert. Jede Ratte wurde mit Klebeband in Seitenlage auf dem Operationstisch fixiert, wobei das rechte Bein zusammen mit dem Schwanz nach kraniodorsal gezogen und das linke Hinterbein in die dafür speziell hergestellte Halterung (Physik Institut der Universität Zürich, Schweiz) eingespannt wurde (Abb. 3).

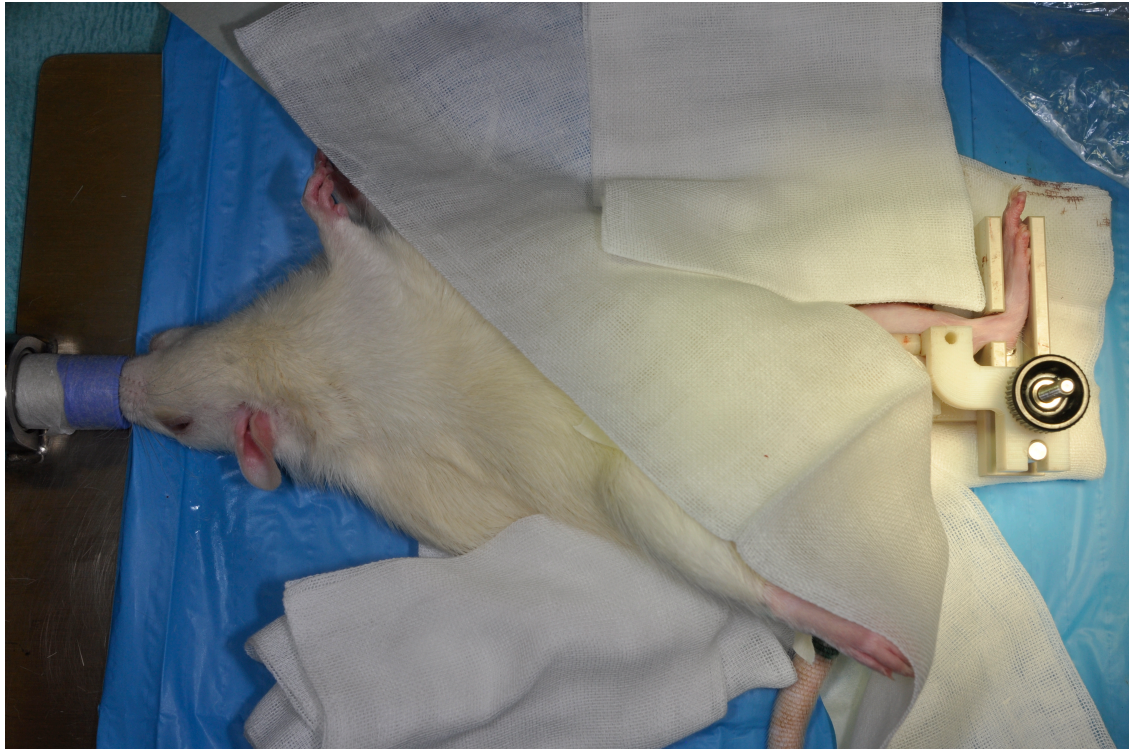


Abb. 3: Lagerung bei Operation

Die Halterung für das linke zu operierende Bein wurde so ausgerichtet, dass die Wadenmuskulatur nach kaudal geschoben wurde und der chirurgische Zugang zur Tibia von medial erfolgte. Vor dem Eingriff wurde die mediale Tibiaregion nochmals mit 80 % Ethanol besprüht. Die Operationen fanden unter sterilen Bedingungen statt.

2.6.2 Chirurgischer Eingriff

Der Zugang erfolgte durch eine circa 15 mm lange Inzision entlang des medialen Tibiaschaftes.

Nach dem Freipräparieren des Knochens wurde mit einem Bohrer (1.1 – 1.5 mm Thommen Medical AG, Waldenburg, Schweiz), mit Hilfe einer zur Halterung

gehörenden Bohrschablone ein Bohrloch durch die Kortikalis in die Spongiosa gefertigt. Um eine Schädigung des Knochens durch die Wärmeentwicklung bei der Bohrung zu vermeiden, wurde der Bohrer beim Bohrvorgang durch Auftropfen von steriler 0,9 % NaCl-Lösung gekühlt. Anschliessend wurde die Schraube mit der Konditionierungslösung benetzt und mit dem zugehörigen Schraubenzieher (Thommen Medical AG, Waldenburg,) implantiert. Nach dem Festziehen des Implantats wurde die PEEK Schutzkappe auf den Schraubenkopf aufgesetzt. Der Wundverschluss erfolgte mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 6/0 Ethicon New Jersey, NY, USA), wobei zunächst das Weichteilgewebe fortlaufend adaptiert wurde. Die Haut wurde durch eine fortlaufende Intrakutannaht mit dem gleichen Nahtmaterial verschlossen. Die Wunde wurde mit einem wasserdampfpermeablem Sprühverband (Opsite, Smith & Nephew, London,, England) abgedeckt.

2.6.3 Postoperatives Management

Nach dem Ende der Operation wurden die Tiere einzeln in beheizte Aufwachboxen verbracht und erst nach Wiedererlangen der Gehfähigkeit in ihren Gruppenkäfig zurückgesetzt. Während der Aufwachphase wurden alle Tiere konstant tierärztlich überwacht. Die Ratten verblieben zur Überwachung bis zu vier Stunden nach der Operation in den Räumen der Operationsvorbereitung. Danach wurden die Käfige wieder in den Tierraum gebracht.

In der weiteren postoperativen Phase wurde das Allgemeinbefinden der Ratten zweimal täglich, am Wochenende und an Feiertagen einmal täglich kontrolliert. Zusätzlich erfolgte einmal wöchentlich eine Gewichtskontrolle.

2.7 Analgesie

Zur postoperativen Schmerzausschaltung wurde Buprenorphin (0.05 mg/kg KGW; Temgesic®, Reckitt Benckiser, Wallisellen, Schweiz) einmal in der Aufwachphase beim ersten Anheben des Kopfes und ein zweites Mal nach vier Stunden subkutan verabreicht. Anschliessend bekamen die Ratten über weitere drei Tage Buprenorphin ad libitum über das Trinkwasser (2 ml Temgesic®/ 120 ml

Trinkwasser; 0.3 mg Buprenorphin/1 ml Temgesic®). Die Wasseraufnahme und eventuelle Schmerzzeichen wurden zweimal täglich, am Wochenende und an Feiertagen einmal täglich, kontrolliert.

2.8 Probengewinnung und Aufbereitung

Alle Ratten wurden 4 Wochen nach der Operation euthanasiert. Hierzu wurden sie nacheinander mit einem Chiplesegerät (MiniMax II Datamars®, Bedano, Schweiz) identifiziert und in eine Narkosebox gesetzt, die mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch (5 % Isofluran in 400 ml Sauerstoff/min) geflutet wurde. Nach Bewusstseinsverlust wurde die Narkose über eine Gesichtsmaske mit Isofluran in Sauerstoff (5 % Isofluran in 400 ml Sauerstoff/min) aufrechterhalten und es wurden 2-5 ml Blut aus der Jugularvene in Serumröhrchen (Serumröhrchen 4,5 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) entnommen. Danach wurden die Ratten durch eine intracardiale Injektion mit Pentobarbital (Esconarkon®, Streuli Pharma AG Uznach, Schweiz) euthanasiert.

Die Tiere wurden nun in einer Kühlbox zum Tierspital Zürich, Schweiz, transportiert und dort seziert. Das Blut wurde ebenso zum Tierspital verbracht und dort im Labor bei 2300 g 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge Rotanta 460S, Hettich AG, Bäch, Schweiz), das Serum mit individuellen Pipettenspitzen portionsweise in je 2 - 3 Eppendorfgefäße (Eppendorfgefäße, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pro Tier pipettiert und bei -80°C eingefroren.

Danach wurden die vom Sponsor gewünschten Organproben von M. gastrocnemius rechts, Gastrocnemiussehne rechts, Leber und Milz entnommen. Diese wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und in individuell beschrifteten Kunststoffschalen (Gefrierschale aus Styrol-Acrylnitril (SAN), Reuter GmbH, Bern, Schweiz) bei -80°C gelagert. Die Untersuchungen dieser Proben werden vom Sponsor durchgeführt und sind nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Bei allen Ratten wurde die linke operierte Tibia entnommen, die Weichteile vom Knochen abpräpariert und diese, zum Schutz vor Austrocknung in 0,9 % NaCl getränkte Gaze gewickelt.

Je eine Serumprobe pro Tier wurde zu einem späteren Zeitpunkt in Trockeneis verpackt und zur Analyse der ActRIIB-AK Konzentration in ein Labor des Sponsors geschickt.

Alle 61 Tibiae wurden mikro-computertomographisch untersucht, 31 der 61 Tibiae wurden zusätzlich biomechanisch getestet, die anderen 30 zusätzlich histologisch ausgewertet.

2.9 Makroskopische und mikroradiologische Evaluation

Die makroskopische Evaluation der einzelnen Tibiae erfolgte adspektorisch und palpatorisch. Es wurde auf Weichteilveränderungen um die Schutzkappe/das Implantat, Flüssigkeitsansammlungen, die Ausbildung und Form eines Kallus und auf Frakturen untersucht. Der Sitz des Implantats und ggf. Knochenveränderungen an der Tibia wurden fotografisch mit einer Spiegelreflexkamera (Digital Reflex Kamera D5000, Nikon, Egg/ZH, Schweiz) dokumentiert, die Knochenstruktur zusätzlich mikroradiologisch (Faxitron Cabinet X Ray System, LX-60, Faxitron X-ray Corporation, Tucson, AZ, USA) dargestellt.

2.10 MicroCT –Technik

Anschliessend wurden die Tibiae einzeln für sieben Tage in 4 % Formalin (Formafix, Hittnau, Schweiz) fixiert, gewässert, in 50 % Ethanol und danach in 70 % Ethanol eingelegt.

Die Proben wurden im μ CT (μ CT 100, SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) so untersucht, dass sie anschliessend noch für die histologische Untersuchungen verwendet werden konnten.

Der auszuwertende Bereich (region of interest, ROI) war die Knochen/Implantat Oberfläche und die knöcherne Region um das Implantat.

Die Proben wurden gedreht, um die Implantatachse an die z-Achse des Datasets anzupassen. Um die Region um das Implantat aufzuteilen, wurden die Daten mit einem Gauss'schen Filter (1 voxel, und σ 0.5) gefiltert.

Das Volumen von Interesse (volume of interest, TV) wurde als Zylinder dargestellt, ausgerichtet nach der Implantatachse mit einem äusseren Durchmesser von 3.1 mm (180 voxel).

Im Inneren war der Zylinder limitiert durch die Implantatoberfläche. Aussen war der Zylinder begrenzt durch die Knochenoberfläche. Als Höhenbegrenzung des Zylinders wurde das erste Auftreten des Knochens gewählt und als Ende 10 Voxel über der Spitze der Schraube. Innerhalb dieses definierten Zylinders wurden folgende standard-morphometrische Kennziffern ermittelt: BV/TV Trabecular Bone Volume Density ; BS/TV Trabecular Bone Surface Density; BS/BV Specific Bone Surface ; Tb.Th Trabecular Thickness; Tb.Sp Trabecular Separation; Tb.N Trabecular Number; DA Degree of Anisotropy; SMI Structure Model Index, Conn.D Trabecular Connectivity Density [67].

Alle diese Werte wurden definiert, um die Morphologie von spongiösem Knochen zu charakterisieren.

BV/TV steht für Anteil des Knochenvolumens am Totalvolumen und beschreibt den Anteil eines vorgegebenen Volumens (Volumen of interest VOI), der von mineralisiertem Knochen bedeckt ist. BV/TV wird normalerweise als Prozentwert angegeben. BS/TV steht für das Verhältnis zwischen Knochenoberfläche und gemessenem Totalvolumen. BS/BV beschreibt die spezifische Knochenoberfläche eines Objekts oder die Kontaktfläche (Interface) zwischen zwei Objekten. Somit ist er ein guter Parameter um den Knochenumbau zu beschreiben, da sich Knochenresorption und Knochenneubildung nur an der Oberfläche abspielen. Ein hoher BS/BV-Wert steht für einen hohen Knochenumbau

Tb.Th, Tb.Sp und Tb.N stehen für die Dicke, die Separation und die Anzahl der Knochenbälkchen in einem definierten Bereich. Dies sind wichtige Parameter zur Charakterisierung der dreidimensionalen Struktur von spongiösem Knochen.

DA bezeichnet den Grad der Anisotrophy und ist somit ein weiterer Parameter, um die Stärke des spongiösen Knochens zu messen. DA wird aus dem Verhältnis zwischen maximalen und minimalen Radius der mittleren Abschnittslänge (Mean intercept length MIL: mittlere Distanz zwischen zwei Knochengrenzschichten) ermittelt.

SMI ist ein Parameter, um den Strukturtyp des Knochens quantitativ zu berechnen

Conn.D ist ein Wert zur Messung freier Knochenbälkchen.

2.11 Histologische Evaluation

Danach durchliefen die für die histologische Untersuchung vorgesehenen Proben (n=30) die routinemässige histologisch-aufbereitende Prozedur. Sie wurden in einer aufsteigende Alkoholreihe (50-100 %) dehydratisiert und anschliessend 8 Tage in Xylol unter Vakuum entfettet.

Danach erfolgte die Einbettung in flüssiges Methylmethacrylat (MMA), das dann zu schnittfestem Polymethylmetacrylat PMMA polymerisierte [68, 69].

Um ein genaues Erkennen der Schnittebene zu ermöglichen, wurde ein Aluminiumpin (ETH Hönggerberg, Zürich, Schweiz) angefertigt, welcher passgenau auf den Schraubenkopf gesteckt wurde und beim darauffolgenden Zuschneiden der Präparate als Orientierung für die Schraubenachse diente. Die Knochen mit dem Implantat wurden mit einer Knochensäge (EXACT, Advanced Technologies GmbH, Typ/No 300/30-1141, EXACT Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) entlang des Pins und somit auch entlang der Längsachse der Schraube durchgesägt. Hierbei entstanden Schnitte mit einer Dicke zwischen 270 - 980 μm .

Anschliessend wurden die Schnitte auf einen Objektträger (Perspex GS Acrylicglas Opal 1013 Wachendorf AG Technische Industrieprodukte, Basel, Schweiz) aufgeklebt, um 50 - 150 μm mit 800er und 1200er Schleifpapier auf 170-766 μm herunter geschliffen (EXACT Schleifmaschine Tp AW 110; EXACT Apparatebau

GmbH, Norderstedt, Deutschland), fünf Minuten mit 4000er Papier poliert und abschliessend mit Toluidinblau gefärbt.

2.12 Qualitative und quantitative histologische Auswertung

Die Dickschnitte wurde auf das Auftreten bestimmter Entzündungszellen (Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen, Riesenzellen) und bindegewebiger Membranen hin semiquantitativ untersucht, um Zeichen einer entzündlichen oder Fremdkörperreaktion festzustellen. Dafür wurden unter dem Mikroskop (Leica M420® Leica Microsystems, Glattbrugg Schweiz) zwei Regionen beidseits der Schraube definiert (Abb. 4).

Um den Grad der Osseointegration zu bestimmen, wurde der Bone-implant-contact (BIC) gemessen. Für die BIC-Messung wurde jeder Dickschnitt zunächst unter einem Makroskop angeschaut und mit einer 45fachen Vergrösserung fotografiert (Leica Macroscope Z6 APO A, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Anschliessend wurden die Bilder mit ImageAccess Standard (Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz) ausgewertet (Abb. 17). Dafür wurde jeweils auf der linken und rechten Seite der Schraube die Strecke zwischen zwei Gewinden (jeweils die breiteste Stelle des Schraubenquerschnitts) definiert (Abb. 4), anschliessend die Gesamtstrecke links und rechts und die mit Knochen bedeckten Strecken links und rechts gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

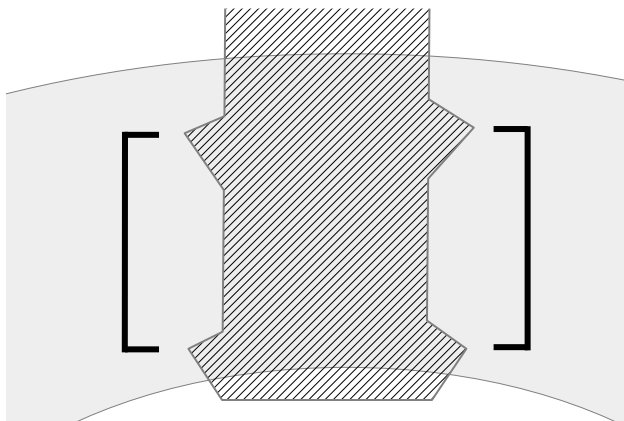


Abb. 4: Schraube (schraffiert) in cis-Kortex (=Kortex nah dem Schraubenkopf) der Tibia (grau) mit eingezeichnetem Messbereich für Bone-implant contacts (Klammer) und Zellzahl

2.13 Biomechanische Testung

Nach der Entnahme der Tibiae wurden die Knochen in NaCl getränkte Gaze gewickelt. Diejenigen, die für die biomechanische Testung vorgesehen waren (n=31), wurden in gekühlten Transportgefäßen (4-8°C) am Tag der Euthanasie in das Testinstitut gebracht (ETH,Hönggerberg Zürich, Schweiz) und dort einzeln getestet.

Zunächst wurde die PEEK Schutzkappe entfernt und proximal des Implantats ein Stück der Tuberositas tibiae abgefräst (Dremel Modell 4000, 38 mm, Dremel®, Breda, Niederlande), um die Knochen in die Testhalterung einspannen zu können.

Danach wurde die Tibia in einer speziell angefertigten Wanne in Hartgips eingebettet (Fujirock® EP,verbesserter Typ4 Superhartgips, GC, Leuven, Belgien). Um eine korrekte Ausrichtung des Implantats zu gewährleisten, wurde der Schraubenkopf vor dem Einbetten in eine dafür vorgesehene Halterung (Abb. 5) eingespannt.

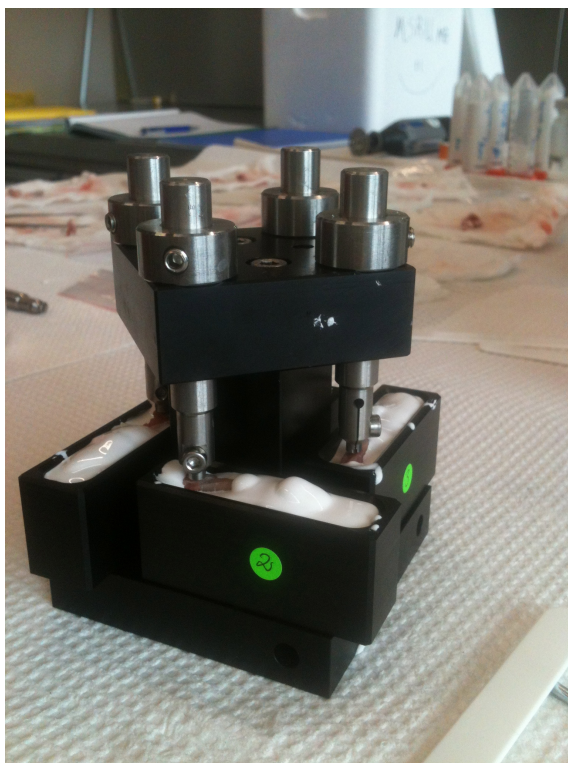
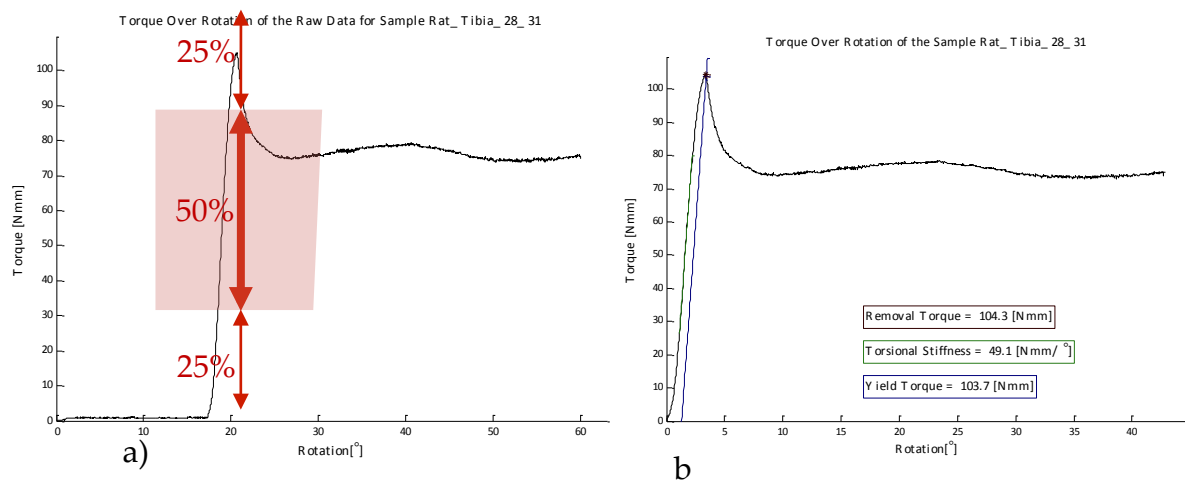


Abb. 5: Halterung für biomechanische Testung

Nach dem Aushärten des Gipses wurde ein Torque Test [70] mit einer maximalen Rotation von 60° und $0,5^\circ/\text{s}$ durchgeführt. Gemessen wurde das Ausdrehmoment (Removal Torque) beim Herausdrehen der Schraube in Nmm, die Steifigkeit der Kontaktfläche zwischen Implantat und Knochen (Interfacial Stiffness in Nmm/ $^\circ$) und der Yield Torque. Der Yield Torque beschreibt den Wert, an dem sich ein Material unter Einwirkung von Kräften beginnt plastisch zu verformen. Hierfür wurden die Proben in eine Maschine eingespannt (Instron ElectroPuls E10000, INSTRON®, Pfungstadt, Deutschland), welche an einen Verstärker angeschlossen war (D2209, accuracy 1 Nmm, Lorenz® Messtechnik GmbH, Alfdorf, Deutschland). Die gemessenen Werte wurden in MATLAB (R2008, The MathWorks, Inc. Massachusettes, USA) aufgezeichnet. Nachdem die Messungen beendet waren, wurden die Proben am gleichen Tag wieder bei $4-8^\circ\text{C}$ gekühlt ins Tierspital gebracht.

Die Interfacial Stiffness wurde mit einer linearen Regression der Torque-Rotationskurve in der linearen Region bestimmt (Abb. 6 b, grüne Linie). Um Extremwerte der Steifigkeit auszuschliessen, wurde die lineare Region als der mittlere 50% Bereich zwischen 0 Nmm und dem Ausdrehmoment definiert. Alle Werte über und unter 25% der Torque-Rotation-Kurve wurden exkludiert (Abb. 6 a). Das Ausdrehmoment wurde definiert als das maximale Moment, das erreicht wurde, bevor es zu einem klaren Abfall des Drehmoments kam (Abb. 6 b, roter Punkt). Dies zeigt das Versagen der Bone-Implant Interface. Der Yield Torque wurde definiert als Schnittpunkt zwischen einer geraden Linie parallel zu dem initialen Anstieg der Torque-Rotations-Kurve und der Torque-Rotationskurve selbst (Abb. 6 b).



2.14 Serum: Bioanalytische Methode

Je eine Serumprobe pro Tier wurde auf Anfrage des Sponsors gefroren in Trockeneis verpackt zur Analyse der ActRIIB-AK Konzentration in ein Labor des Sponsors geschickt.

Um die Konzentration des ActRIIB-AK im Serum zu messen, wurde ein ELISA durchgeführt. Hierfür wurde eine Mikrotiterplatte mit einem human rekombinanten ActRIIB benetzt und anschliessend ActRIIB-AK hinzugefügt, welches von dem Rezeptor gebunden wurde.

Danach wurde ein mit Biotin markierter ActRIIB dazu gegeben, welcher dann detektiert wurde.

2.15 Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit einem Statistikcomputerprogramm IBM SPSS Statistics 22 (2013, IBM Corp., Armonk, NY, USA) durchgeführt.

Aus den erhobenen Werten wurden mittels deskriptiver Statistik Mittelwerte und Standardabweichung festgestellt.

Die Daten wurden einer univariante Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen, um Gesamtunterschiede zwischen den Gruppen zu erheben.

Der Post-Hoc Test (Bonferroni) wurde bei den Daten der Körpergewichtszunahme, des BICs, des μ CTs und der biomechanische Testung durchgeführt, um Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen.

Ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant definiert.

3 Resultate

3.1 Tiermanagement

3.1.1 Tierhaltung

Vier Ratten zeigten einmalig oberflächliche Bissverletzungen im Nacken-Schulterbereich, die aber innerhalb von 2-10 Tagen ohne Therapie wieder abheilten.

3.1.2 Körpergewicht

Alle Tiere zeigten eine geringgradige Gewichtsreduktion beim ersten Wiegen nach der Operation (3. Wägung) gegenüber der 2. Wägung. Diese Abnahme war aber innerhalb der darauffolgenden Woche wieder ausgeglichen. Von diesem Zeitpunkt an (4. Wägung) konnte eine stetige Gewichtszunahme vermerkt werden. Tiere der Gruppe 5T (fünfmalige Injektion der Testsubstanz) und 3T (dreimalige Injektion der Testsubstanz) zeigten eine signifikant ($p < 0.05$) höhere Gewichtszunahme zwischen der 1. und 6. Messung als die Tiere der Gruppe 5P (fünfmalige Injektion des Placebos). Zwischen Gruppe 5T und 3T gab es keine signifikanten Unterschiede im Verlauf des Körpergewichtes (Abb. 7, Tab. 12).

Alle Gewichte der Tiere sind in Tabellen 5-11 im Anhang aufgelistet. Die Gewichtszunahmen sind in den Abbildungen 10-15 im Anhang dargestellt.

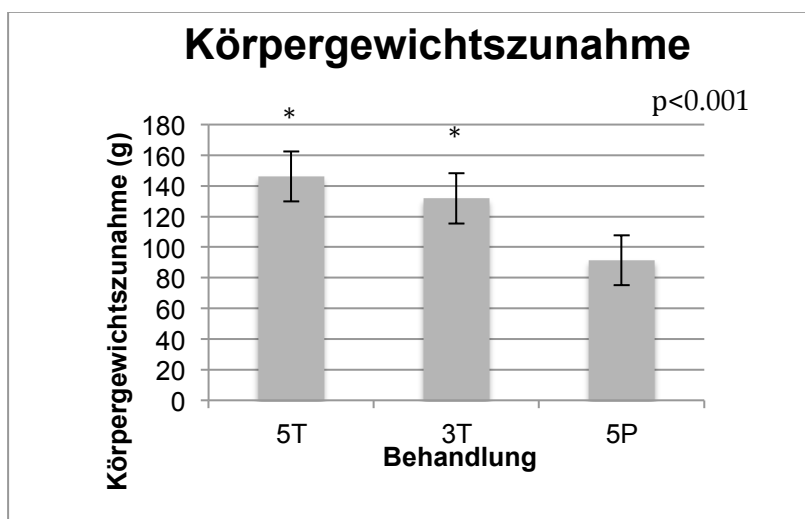


Abb. 7: Körpergewichtszunahme der Ratten während der Lebendphase. 5P: 5 Injektionen Placebo, 5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, *: $p < 0,05$

3.1.3 Sentineluntersuchung

Die Sentinels zeigten zu keinem Zeitpunkt klinische Auffälligkeiten und waren in der Sektion frei von pathologischen Veränderungen. Der indirekte Immunfluoreszenztest zeigte, dass die Tiere frei von untersuchten Viren und Mykoplasmen waren. Eine der drei Ratten zeigte ein positives Testresultat auf Pasteurellen (Pharynx) und alle drei Ratten zeigten ein positives Resultat auf Staphylococcus aureus (Pharynx). Diese Ergebnisse haben keinen Einfluss auf die Resultate der Studie.

3.2 Injektionen

Die Injektionen wurden zu den vorgegebenen Zeitpunkten durchgeführt und es konnten keine klinischen Nebenwirkungen beobachtet werden.

3.3 Anästhesie/ Operation

Die Narkosen verliefen ohne Zwischenfälle. Die Operationen an allen Ratten verliefen ohne Komplikationen und konnten wie geplant durchgeführt werden.

3.4 Postoperatives Management

Alle Ratten erholten sich ohne Schwierigkeiten innerhalb einer Stunde von der Anästhesie. Futter- und Wasseraufnahme, sowie Gliedmassenfunktion waren unauffällig. Bei neun Ratten zeigte sich eine geringgradige Wundschwellung und oberflächliche Nahtdehiszenz; der Knochen war jedoch stets mit Weichteilen gedeckt. Die Wunden heilten alle nach maximal 10 Tagen ohne Therapie gut ab (Tab. 13).

Keine der Ratten zeigte postoperativ Schmerzáusserungen oder Lahmheit.

Die Ratte 28.59 starb acht Tage nach der Operation noch vor der ersten ActRIIB-AK Injektion. Die Pathologie zeigte keinen Zusammenhang zwischen Studie und Todesursache, sondern eine akute Bronchopneumonie unbekannter Ursache.

3.5 Resultate der post mortem Untersuchungen

3.5.1 Probengewinnung und Aufbereitung

Die Blutentnahme und die darauffolgende Euthanasie verliefen ohne Komplikationen. Alle Implantate und PEEK Schutzkappen waren in situ und weder am Knochen noch am Weichteilgewebe konnten andere als postoperativ erwartbare pathologische Befunde erhoben werden.

3.5.2 Röntgenbilder der Knochen

Es konnte bei keinem der operierten Knochen eine Resorption oder Sklerose im Bereich um das Implantat festgestellt werden. Bei vier Ratten aus jeder Gruppe konnte eine gering- bis mittelgradige Kallusbildung im Bereich des Implantats diagnostiziert werden. Bei zwei Ratten der Gruppe 5P und einer der Gruppe 3T und einer der Gruppe 5P war die Schraube schräg im Knochen implantiert. Bei vier Ratten der Gruppen 5T und einer Ratte der Gruppe 3T war die Schraube zwar gut in der nahen Cis-Cortex, aber nicht vorständig in der fernen Trans-Cortex lokalisiert. Es wurden keine Frakturen gefunden (Tab. 14).

3.5.3 Mikroradiographien

Ungefähr die Hälfte der Schnitte wies eine gering-mittelgradige Kallusbildung auf. Es gab keine Anzeichen von Knochenresorption und/oder Sklerose (Tab. 15) im Bereich um das Implantat. Drei Tibiae der Gruppe 5P und je eine Tibia der Gruppen 5T und 3T zeigten Frakturen. Diese waren alle an der Transcortex lokalisiert und ohne jegliche Knochenreaktion, sodass diese Schnitte nicht von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

3.5.4 μ CT

Die Evaluation der Mikroarchitektur des Knochens um das Implantat zeigte eine grosse Variabilität sowohl innerhalb als auch zwischen den Gruppen, jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Lediglich der Abstand zwischen den

Knochenbälkchen (Trabecular Separation Tb.Sp [mm]) und die Anzahl der Knochenbälkchen (Trabecular Number Tb.N [1/mm]) waren zwischen den Gruppen 5P und 3T statistisch signifikant unterschiedlich. Bei Gruppe 5P war die Tb.Sp signifikant grösser als bei Gruppe 3T ($p < 0.05$). Umgekehrt war die Tb.N bei der Gruppe 3T signifikant höher als bei Gruppe 5P ($p < 0.05$).

3.5.5 Histologie

- Qualitative Histologie (Dickschnitte)

Alle Dickschnitte waren gleichmässig gefärbt und konnten zur Evaluation herangezogen werden. Bei allen Präparaten konnte eine direkte Knochenanlagerung an das Implantat festgestellt werden. Im kortikalen Bereich war ein durch das Einbringen des Implantats bedingter, physiologischer Knochenumbau zu sehen.

Bei keinem der Präparate wurde eine pathologisch erhöhte Anzahl an Entzündungszellen oder eine fibröse Membran gefunden (Tab. 16).

- Quantitative Histologie (Dickschnitte, BIC)

Der Bone-implant-contact (BIC) wurde immer links und rechts am Implantat zwischen zwei Schraubengewinden gemessen und dann jeweils aufsummiert. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Es zeigte sich eine hohe Variabilität innerhalb und zwischen den Gruppen (Tab. 18). Die Mittelwerte der BIC Messung zeigen Tab. 2 und Abb. 8. Die Abb. 8 zeigt allerdings auch eine Tendenz zum höheren BIC der Gruppe 5P im Vergleich zur Gruppe 5T ($p < 0.05$). Die Gruppe 5T hat mit einem mittleren BIC von 55.70 % im Vergleich zu den Gruppen 3T (70.80 %) und 5P (73.10 %), einen schwächeren Knochen-Implantat-Kontakt.

Tab. 2: Quantitative Evaluation der Dickschnitte (mittlerer BIC)

Code	ges. li (μm)	ges. re (μm)	BIC li* (μm)	BIC re** (μm)	% li*	% re**	% mean re**/li*
5T	1266.76	1327.438	728.065	859.431	51.01	64.46	55.7
3T	1341.957	1311.404	884.688	997.371	65.63	75.76	70.8
5P	1261.202	1249.634	904.848	956.708	71.1	75.21	73.1

5P: 5 Injektionen Placebo, 5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, *n=9, **n=10 BIC: Bone-Implant Contact, li: links, re: rechts, ges: gesamt, mean: Mittelwert

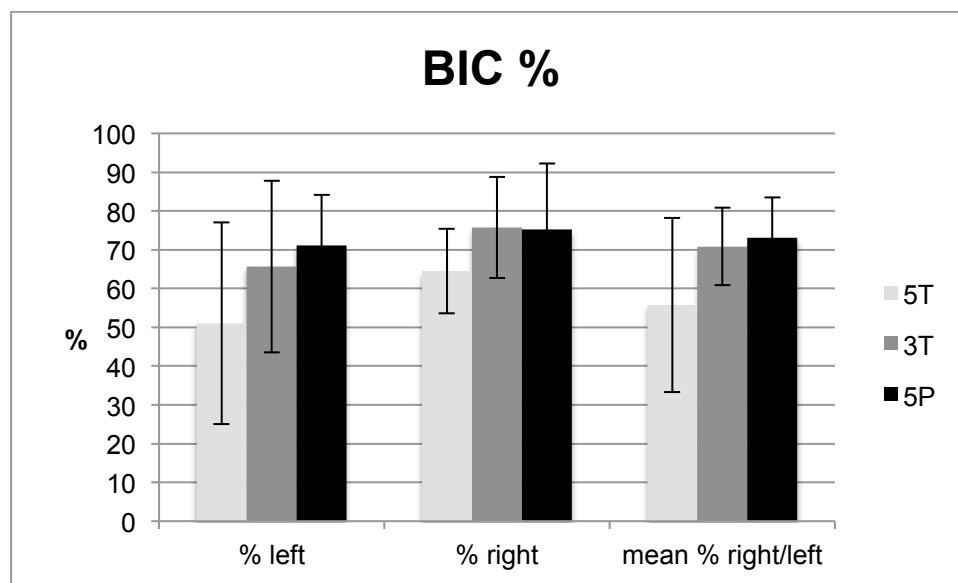


Abb. 8: Quantitative Evaluation der Dickschnitte (mittlerer BIC) %

Prozentualer Anteil des ausgewählten Implantatbereichs, der mit Knochen bedeckt ist. 5P: 5 Injektionen Placebo, 5T: 5 Injektionen ACTRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ACTRIIB-AK, left: links; right: rechts; mean: Mittelwert

3.5.6 Biomechanische Testung

Alle Proben ausser zwei (28.34 und 28.38) der Gruppe 5T zeigten einen eindeutigen Versagenszeitpunkt der Knochen/Implantatverbindung (failure point). Dennoch konnte für alle untersuchten Proben ein Drehmoment gemessen werden. Alle Werte sind in Tab. 17 aufgelistet. Die jeweiligen Mittelwerte zeigen Tab. 3 und Abb. 9. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen für alle drei gemessenen Parameter, jedoch zeigt Gruppe 5T die höchsten Ergebnisse, gefolgt von Gruppe 3T. Die Gruppe 5P zeigt in allen drei Parametern die niedrigsten Werte.

Tab. 3: Mittelwerte der biomechanischen Testung für die Gruppen 5T, 5P und 3T

	5T**	5P**	3T*
Interfacial stiffness	38.6480	37.6610	33.8591
Removal torque	97.4610	91.5850	92.5927
Yield torque	96,3490	89,1920	90.5245

5P: 5 Injektionen Placebo, 5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, *n=11, ** n=10

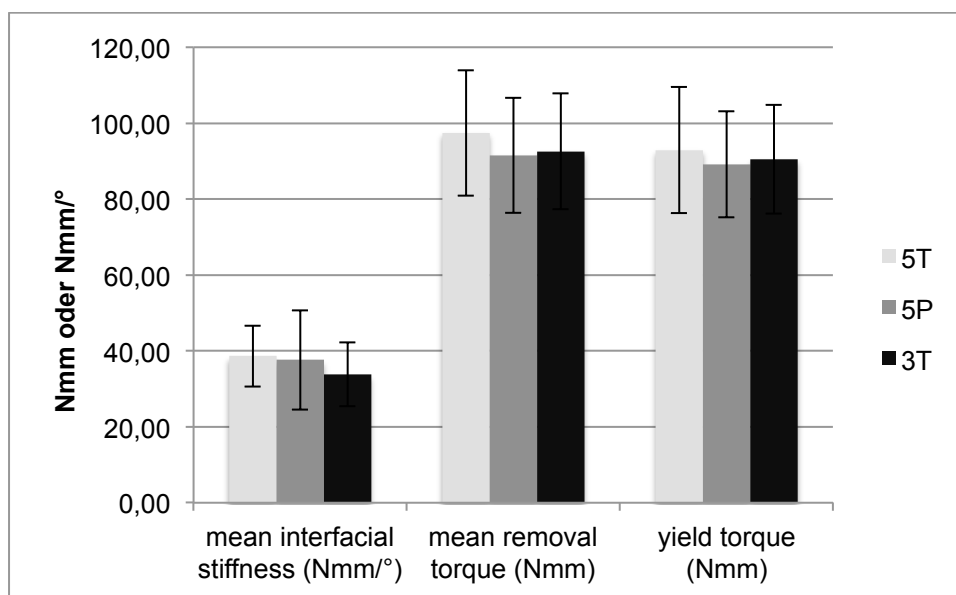


Abb. 9: Mittelwerte (mean) für die biomechanische Testung

5P: 5 Injektionen Placebo, n=10, 5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, n=10, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, n=11, Nmm: Newton-millimeter, Nmm/°: Newton-millimeter per grade

3.6 Serumanalyse

Die Auswertung der Serumproben fand in einem vom Sponsor vorgegeben Labor statt, ebenso auch die Interpretation der Werte. Alle hier genannten Daten sind dem Report des Labors entnommen. In allen Serumproben der Tiere aus Gruppe 5T und 3T konnte ActRIIB-AK nachgewiesen werden, wobei sich eine gewisse Variabilität in der Konzentration zeigte. Im Serum der Tiere, die ausschliesslich mit dem Placebo behandelt wurden (Gruppe 5P), konnte dagegen kein ActRIIB-AK nachgewiesen werden (Tab. 4). Zwei Tiere der Gruppe 5T zeigten reduzierte Serumkonzentrationen von ActRIIB-AK. Alle Serumwerte sind in Tab. 19 im Anhang aufgelistet.

Tab. 4: Mittlere Serumkonzentration für ACTRIIB-AK

Code	Konzentration	Variationskoeffizient	Anzahl der Tiere
Gruppe 5P	BLQ	n/a	20
Gruppe 5T	1020	37	20
Gruppe 3T	854	32	21

5P: 5 Injektionen Placebo, 5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, n/a: not applicable, Konzentrationsangabe in µg/mL; BLQ: Below limit of quantification

4 Diskussion

4.1 Ziel der Studie

Das Ziel dieser in vivo Studie an 61 männlichen RCC Han Wistar Ratten war es, die potentiellen Effekte von ActRIIB-AK in zwei möglichen Konzentrationen auf die Osseointegration von Titanimplantaten im Vergleich zu einem Placebo zu testen. Die Ergebnisse der Histologie und der biomechanischen Testung zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Analyse der μ CT Bilder zeigt signifikant höhere Werte bezüglich der Anzahl und der Abstände der Knochenbälkchen zwischen den Gruppen 5P und 3T.

4.2 Tiermodell Ratte

Die Tibia der Ratte als Lokalisation für Implantate ist gut untersucht [3, 5, 71]. Durch den geringen Anteil an Weichteilgewebe in diesem Bereich ist der chirurgische Zugang technisch nicht anspruchsvoll. Bei manchen Tieren wurden postoperativ Weichteilgewebereaktionen an der Implantationsstelle festgestellt. Das Implantat war stets bedeckt und die Wunden heilten bei allen Tieren ohne therapeutische Massnahmen nach wenigen Tagen ab. Es gab hierbei keine Unterschiede zwischen den Gruppen, auch in der Literatur gibt es keinen Hinweis, dass die Antagonisierung von Aktivin Wundheilungsstörungen verursachen kann. Es ist davon auszugehen, dass die Weichteilveränderungen durch postoperative Selbstmutilation entstanden sind und nicht mit der Verabreichung von ActRIIB-AK in Zusammenhang stehen.

Nager gelten auf Grund vieler Vorteile bezüglich des Managements als geeignete Versuchstiere. Dies führte zu einer Vielzahl von Ergebnissen und einer umfassenden Kenntnis über den Knochenstoffwechsel von Ratten [2, 3, 5, 18].

4.1 Titan als verwendetes Implantatmaterial

Titan wird in der Literatur auf Grund seiner hervorragenden Biokompatibilität als beliebter Implantatwerkstoff beschrieben [2, 74]. Dies zeigte sich auch hier, da keine

Zellen und/oder bindegewebigen Membranen zwischen Implantat und Knochenbett gefunden wurden und somit alle Implantate ohne Entzündungsreaktionen einheilten. Das spricht für eine hohe Biokompatibilität des Implantats. Weiterhin ist dies ein Hinweis darauf, dass die intravenöse Applikation von ActRIIB-AK die Verträglichkeit des Implantats nicht negativ beeinflusste.

4.2 ActRIIB-AK

Bei den meisten Tieren zeigte sich ein geringer Gewichtsverlust in der Woche nach dem chirurgischen Eingriff. Studien zeigen, dass postoperativ verabreichtes Buprenorphin zu einer verminderten Futteraufnahme und demzufolge auch zu einer Gewichtsreduktion führen kann [72]. Alle Tiere erreichten ihr Anfangskörpergewicht wieder innerhalb von zwei Wochen. Von diesem Zeitpunkt an wurde bei allen Tieren bis zur Euthanasie eine kontinuierliche Gewichtszunahme festgestellt. Die Tiere der Gruppen 5T und 3T zeigten eine signifikant ($p=0.000$) höhere Gewichtszunahme zwischen der ersten und der letzten Wägung verglichen mit den Tieren der Gruppe 5P. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien, die zeigten, dass ActRIIB-AK eine Steigerung der Körpermasse zur Folge haben kann [63, 64, 73]. Ob die vermehrte Körpergewichtszunahme der Tiere dieser Studie einer Zunahme der Muskelmasse oder einer Zunahme des Körperfettanteils zuzuschreiben ist, bleibt offen, da diesbezüglich keine weiteren Untersuchungen eingeleitet wurden. Es konnten weder zum Zeitpunkt der Injektion, noch während der gesamten Lebendphase Nebenwirkungen des ActRIIB-AK festgestellt werden. Vorangegangene Studien verwendeten eine deutlich niedrigere Dosierung in anderen Dosierungsschemata von ActRIIB-AK (10 mg/ KGW) [14, 63, 64]. Da es aber weder in früheren noch in dieser Studie injektionsbezogene Zwischenfälle gab, spricht dies für eine gute Verträglichkeit des Medikaments.

4.3 Radiologische Auswertung

4.3.1 Mikroradiographien

Die radiologische Auswertung der Knochen ergab, dass nicht alle Schrauben gleich weit in der Kortex verankert waren. Das lag vermutlich daran, dass die Ratten trotz gleichen Alters unterschiedlich schwer und gross waren. Die Halterung und die Bohrschablone dagegen waren standardisiert und nicht in der Grösse verstellbar. Trotz der unvollständigen Verankerung des Implantates im Knochen konnte sowohl die biomechanische Testung als auch die μ CT-Analyse problemlos durchgeführt werden. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Lokalisation des Implantats und den ermittelten Werte bezüglich Steifigkeit des Implantat-Knochen-Komplexes, des Ausdrehmoments und dem Yield Torque festgestellt werden. Auf Grund der geringen Implantatlänge war es grundsätzlich nicht möglich die Schraube komplett in der Transkortex zu verankern. Je nach Grösse der Ratte bzw. der Tibia konnte bei manchen Tieren die Schraubenspitze in die Transkortex eingebracht werden. Dabei war aber in keinem Fall Gewinde in der Transkortex. Somit ist davon auszugehen dass die Implantatstabilität allein durch die Verankerung in der Cis-Kortex bedingt ist.

Wegen der schrägen Implantation konnte ein Präparat der Gruppe 5T histologisch nur auf der rechten Seite ausgewertet werden.

In manchen Mikroradiographien der Dickschnitte wurden Zusammenhangstrennungen des Knochens festgestellt. Da alle Knochen nach der Entnahme radiologisch ohne pathologischen Befund waren, können diese Frakturen als Artefakt interpretiert werden, welcher beim Herstellen der histologischen Schnitte entstand. Dies könnte auf Grund der unterschiedlichen Härte und Steifigkeit von Knochen und Metall geschehen sein [75, 76]. Da die Frakturen alle an der implantatfernen Kortex lokalisiert waren, die weiteren Untersuchungen aber nur an der Cis-Kortex durchgeführt wurden, konnten trotz dieser Artefakte alle Schnitte für die Evaluation verwendet werden.

4.3.2 μ CT-Analyse

In μ CT zeigte sich eine grosse Variabilität für alle gemessenen Parameter. Signifikante Unterschiede wurden nur zwischen den Gruppen 3T und 5P gefunden. Die geringere Tb.Sp und die höhere Tb.N bei den Tieren der Gruppe 3T im Vergleich zu 5P lässt einen positiven Effekt des ActRIIB-AK auf den Knochenumbau vermuten. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Gruppe 5P und 5T. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass die Applikation von ActRIIB-AK in einer Dosierung von 10 mg/KGW zweimal wöchentlich über 8 Wochen die Tb.N steigert und die Tb.Sp senkt im Vergleich zu einer Kontrollgruppe [13, 14, 61, 63]. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Gesamtmenge an injiziertem ActRIIB-AK einen Einfluss auf den Knochenumbau hat. So könnte eine vergleichsweise hohe Gesamtdosis sogar einen negativen Effekt auf die Osseointegration haben.

4.4 Histologische Auswertung

Im Kontrast dazu steht die BIC-Auswertung. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gefunden werden. Allerdings zeigte die Gruppe 5P eine Tendenz zum höheren BIC im Vergleich zur Gruppe 5T ($p < 0.05$). Die Gruppe 5T hat mit einem mittleren BIC von 55.70 % im Vergleich zu den Gruppen 3T (70.80 %) und 5P (73.10 %) einen schwächeren Knochen-Implantat-Kontakt. Dies könnte auch mit der hohen Gesamtmenge an appliziertem ActRIIB-AK im Zusammenhang stehen. Das müsste in einer weiteren Studie untersucht werden. Insgesamt ist zu sagen, dass alle Schrauben mit einem BIC zwischen 50% - 70% guten Kontakt mit dem Knochen hatten. Die Unterschiede zu den MicroCT-Ergebnissen sind unter Umständen durch die detaillierterer Auswertung in der Histologie zu erklären. Denkbar sind auch durch das Implantat verursachte Artefakte während der CT Analyse. Letzlich bleibt die Ursache für diese Unterschiede unklar.

4.5 Biomechanische Testung

Die biomechanische Testung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Steifigkeit des Implantat-Knochen-Komplexes, des Ausdrehmoments und dem Yield Torque. Die mechanischen Eigenschaften der Knochen/Implantatverbindung scheinen, trotz der unterschiedlichen BIC- und μ CT –Ergebnisse, bei allen Gruppen gleich zu sein. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den in der Literatur genannten Ergebnisse, dass die Blockade der Signaltransduktion durch den Aktivinrezeptor die Knochenneubildung beeinflusst [12, 14, 57, 63].

4.6 Serumanalyse

Bei der Serumuntersuchung konnte bei allen Serumproben der Gruppen 5T und 3T eine ActRIIB-AK Konzentration nachgewiesen werden. Innerhalb der Gruppen mit ActRIIB-AK-behandelten Tieren gab es eine gewisse Variabilität bezüglich der Konzentrationen, wobei zwei Tiere der Gruppe 5T eine deutlich geringere Menge an ActRIIB-AK aufwiesen als der Rest der Tiere, was vermutlich durch Anti-Drug-Antikörper zu erklären ist. Im Allgemeinen kann es, bedingt durch unterschiedliche Pharmakokinetik und Pharmakogenetik, verschiedene Gründe für diese Unterschiede geben [77, 78]. Da alle Ratten vor jeder Injektion gewogen und die Dosis individuell errechnet wurde können Fehler in der Dosisanpassung ausgeschlossen werden. Häufig in der Literatur gefundene Ursachen für unterschiedliche Serumkonzentrationen bei gleicher Dosisapplikation sind Absorption, Verteilung, Biotransformation, Exkretion, regionale Durchblutung, Bindung an Serumproteine, Transportmechanismen, Ansprechbarkeit des Gewebes, andere Pharmaka, Erkrankungen, Alter, Geschlecht, genetische Unterschiede in der Enzymexpression [77-79]. Auf Grund der Auswahl gesunder, standardisierter Versuchstiere sind die meisten Punkte hier auszuschliessen. Ausser Buprenorphin wurde kein weiteres Medikament verabreicht, deshalb sind auch Wechselwirkungen nicht denkbar. Eine unvollständige Injektion des ActRIIB-AK

wäre auf Grund von Abwehrbewegungen der Ratten beim Injektionsvorgang denkbar. Während der Applikation war allerdings weder eine subcutane Schwellung noch ein anderer Hinweis für eine paravenöse Injektion aufgefallen, demnach könnten höchstens sehr geringe Mengen ins subcutane Gewebe verabreicht worden sein. Auch unterschiedlich lange Lagerzeiten des Serums könnten die Unterschiede erklären. Die Ursache für die unterschiedlichen Serumkonzentrationen bei gleicher Dosierung bleiben letztlich unklar.

4.7 Schlussfolgerung

Die Hypothese, dass die intravenöse Verabreichung von ActRIIB-AK an Ratten einen Einfluss auf die Osseointegration von Titanimplantaten hat, kann in dieser Studie nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die intravenöse Applikation von ActRIIB-AK trotz der zum Teil diagnostizierten Differenzen in der Knochenarchitektur in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der untersuchten Knochen- Implantatbindung hat.

Ein weiterer Effekt des intravenös verabreichten ActRIIB-AK ist eine signifikant höhere Gewichtszunahme der Tiere während der Versuchsphase von 4 Wochen verglichen mit den Tieren, die lediglich ein Placebo erhielten.

5 Literaturverzeichnis

1. Pritchard, J.J., *Repair of fractures of the parietal bone in rats*. J Anat, 1946. **80**(Pt 2): p. 55-60 2.
2. Fujii, N., H. Kusakari, and T. Maeda, *A histological study on tissue responses to titanium implantation in rat maxilla: the process of epithelial regeneration and bone reaction*. J Periodontol, 1998. **69**(4): p. 485-95.
3. Takeshita, F., et al., *Effects of aging on titanium implants inserted into the tibiae of female rats using light microscopy, SEM, and image processing*. J Biomed Mater Res, 1997. **34**(1): p. 1-8.
4. Ohtsu, A., et al., *A histological investigation on tissue responses to titanium implants in cortical bone of the rat femur*. Journal of Periodontology, 1997. **68**(3): p. 270-83.
5. Branemark, R., et al., *Biomechanical characterization of osseointegration during healing: an experimental in vivo study in the rat*. Biomaterials, 1997. **18**(14): p. 969-78.
6. Ysander, M., et al., *Intramedullary osseointegration: development of a rodent model and study of histology and neuropeptide changes around titanium implants*. Journal of rehabilitation research and development, 2001. **38**(2): p. 183-90.
7. Haga, M., et al., *Detailed process of bone remodeling after achievement of osseointegration in a rat implantation model*. Anatomical record, 2009. **292**(1): p. 38-47.
8. Histing, T., et al., *Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting*. Bone, 2011. **49**(4): p. 591-9.
9. Jee, W.S. and W. Yao, *Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2001. **1**(3): p. 193-207.
10. Strube, P., et al., *Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity*. Bone, 2009. **45**(6): p. 1065-72.
11. Mehta, M., et al., *Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing?* Bone, 2010. **47**(2): p. 219-28.
12. Sakai, R., et al., *Activin increases bone mass and mechanical strength of lumbar vertebrae in aged ovariectomized rats*. Bone, 2000. **27**(1): p. 91-6.
13. Lotinun, S., et al., *Activin receptor signaling: a potential therapeutic target for osteoporosis*. Current molecular pharmacology, 2012. **5**(2): p. 195-204.
14. Pearsall, R.S., et al., *A soluble activin type IIA receptor induces bone formation and improves skeletal integrity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(19): p. 7082-7.
15. Nunamaker, D.M., *Experimental models of fracture repair*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S56-65.

16. Branemark, P.I., et al., *Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period*. Scand J Plast Reconstr Surg Suppl, 1977. **16**: p. 1-132.
17. Davies, J.E., *Understanding peri-implant endosseous healing*. J Dent Educ, 2003. **67**(8): p. 932-49.
18. Futami, T., et al., *Tissue response to titanium implants in the rat maxilla: ultrastructural and histochemical observations of the bone-titanium interface*. Journal of Periodontology, 2000. **71**(2): p. 287-98.
19. Meyer, R.A., Jr., et al., *Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats*. J Orthop Res, 2001. **19**(3): p. 428-35.
20. Adell, R., et al., *Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures (I). A 3-year longitudinal prospective study*. Int J Oral Maxillofac Surg, 1986. **15**(1): p. 39-52.
21. Bernhardt, R., et al., *Comparison of bone-implant contact and bone-implant volume between 2D-histological sections and 3D-SRmicroCT slices*. Eur Cell Mater, 2012. **23**: p. 237-47; discussion 247-8.
22. Park, Y.S., et al., *Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration*. Clin Oral Implants Res, 2005. **16**(2): p. 156-60.
23. Cowan, C.M., et al., *MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects*. Tissue Eng, 2007. **13**(3): p. 501-12.
24. Aparicio, C., N.P. Lang, and B. Rangert, *Validity and clinical significance of biomechanical testing of implant/bone interface*. Clin Oral Implants Res, 2006. **17 Suppl 2**: p. 2-7.
25. Branemark, R., et al., *Biomechanical characterization of osseointegration: an experimental in vivo investigation in the beagle dog*. J Orthop Res, 1998. **16**(1): p. 61-9.
26. Branemark, R. and R. Skalak, *An in-vivo method for biomechanical characterization of bone-anchored implants*. Med Eng Phys, 1998. **20**(3): p. 216-9.
27. Branemark, R. and P. Thomsen, *Biomechanical and morphological studies on osseointegration in immunological arthritis in rabbits*. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1997. **31**(3): p. 185-95.
28. Ohnrell, L.O., et al., *Effects of irradiation on the biomechanics of osseointegration. An experimental in vivo study in rats*. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1997. **31**(4): p. 281-93.
29. Balamurugan, A., et al., *Characterization and in vivo evaluation of sol-gel derived hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V substrates*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007. **81**(2): p. 441-7.
30. Leventhal, G.S., *Titanium, a metal for surgery*. J Bone Joint Surg Am, 1951. **33-A**(2): p. 473-4.

31. Canalis, E., *The hormonal and local regulation of bone formation*. Endocrine reviews, 1983. **4**(1): p. 62-77.
32. Rodan, G.A., *Bone mass homeostasis and bisphosphonate action*. Bone, 1997. **20**(1): p. 1-4.
33. Katz, L.H., et al., *Targeting TGF-beta signaling in cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2013. **17**(7): p. 743-60.
34. Pfeilschifter, J. and G.R. Mundy, *Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(7): p. 2024-8.
35. Pfeilschifter, J., S.M. Seyedin, and G.R. Mundy, *Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures*. The Journal of clinical investigation, 1988. **82**(2): p. 680-5.
36. Canalis, E., T. McCarthy, and M. Centrella, *Growth factors and the regulation of bone remodeling*. The Journal of clinical investigation, 1988. **81**(2): p. 277-81.
37. Lambrinoudaki, I., G. Christodoulakos, and D. Botsis, *Bisphosphonates*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1092**: p. 397-402.
38. Canalis, E., A. Giustina, and J.P. Bilezikian, *Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis*. N Engl J Med, 2007. **357**(9): p. 905-16.
39. Robling, A.G., A.B. Castillo, and C.H. Turner, *Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling*. Annu Rev Biomed Eng, 2006. **8**: p. 455-98.
40. Black, D.M., et al., *The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis*. N Engl J Med, 2003. **349**(13): p. 1207-15.
41. MacDonald, B.R. and M. Gowen, *Emerging therapies in osteoporosis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2001. **15**(3): p. 483-96.
42. Deal, C., *Future therapeutic targets in osteoporosis*. Curr Opin Rheumatol, 2009. **21**(4): p. 380-5.
43. Neer, R.M., et al., *Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis*. N Engl J Med, 2001. **344**(19): p. 1434-41.
44. Nicks, K.M., et al., *Regulation of osteoblastogenesis and osteoclastogenesis by the other reproductive hormones, Activin and Inhibin*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **310**(1-2): p. 11-20.
45. Wrzesinski, S.H., Y.Y. Wan, and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(18 Pt 1): p. 5262-70.
46. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 753-91.
47. Hauschka, P.V., et al., *Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose*. J Biol Chem, 1986. **261**(27): p. 12665-74.

48. Oreffo, R.O., et al., *Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts*. Biochemical and biophysical research communications, 1989. **158**(3): p. 817-23.
49. Wiater, E. and W. Vale, *Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7934-41.
50. Farnworth, P.G., et al., *Inhibin binding sites and proteins in pituitary, gonadal, adrenal and bone cells*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **180**(1-2): p. 63-71.
51. Ogawa, Y., et al., *Bovine bone activin enhances bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation*. J Biol Chem, 1992. **267**(20): p. 14233-7.
52. Leto, G., *Activin A and bone metastasis*. Journal of cellular physiology, 2010. **225**(2): p. 302-9.
53. Tsuchida, K., et al., *Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer*. Endocr J, 2008. **55**(1): p. 11-21.
54. del Re, E., et al., *Reconstitution and analysis of soluble inhibin and activin receptor complexes in a cell-free system*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53126-35.
55. Donaldson, C.J., et al., *Activin and inhibin binding to the soluble extracellular domain of activin receptor II*. Endocrinology, 1999. **140**(4): p. 1760-6.
56. Sakai, R., K. Miwa, and Y. Eto, *Local administration of activin promotes fracture healing in the rat fibula fracture model*. Bone, 1999. **25**(2): p. 191-6.
57. Sakai, R. and Y. Eto, *Involvement of activin in the regulation of bone metabolism*. Molecular and cellular endocrinology, 2001. **180**(1-2): p. 183-8.
58. Sakai, R., et al., *Activin enhances osteoclast-like cell formation in vitro*. Biochemical and biophysical research communications, 1993. **195**(1): p. 39-46.
59. Vallet, S., et al., *Activin A promotes multiple myeloma-induced osteolysis and is a promising target for myeloma bone disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(11): p. 5124-9.
60. Perrien, D.S., et al., *Inhibin A is an endocrine stimulator of bone mass and strength*. Endocrinology, 2007. **148**(4): p. 1654-65.
61. Lotinun, S., et al., *A soluble activin receptor Type IIA fusion protein (ACE-011) increases bone mass via a dual anabolic-antiresorptive effect in Cynomolgus monkeys*. Bone, 2010. **46**(4): p. 1082-8.
62. Fajardo, R.J., et al., *Treatment with a soluble receptor for activin improves bone mass and structure in the axial and appendicular skeleton of female cynomolgus macaques (Macaca fascicularis)*. Bone, 2010. **46**(1): p. 64-71.
63. Koncarevic, A., et al., *A soluble activin receptor type IIb prevents the effects of androgen deprivation on body composition and bone health*. Endocrinology, 2010. **151**(9): p. 4289-300.
64. Lee, S.J., et al., *Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18117-22.
65. Ruckle, J., et al., *Single-dose, randomized, double-blind, placebo-controlled study of ACE-011 (ActRIIA-IgG1) in postmenopausal women*. J Bone Miner Res, 2009. **24**(4): p. 744-52.

66. Livingston, R.S., et al., *Transmission of Helicobacter hepaticus infection to sentinel mice by contaminated bedding*. Lab Anim Sci, 1998. **48**(3): p. 291-3.
67. Hildebrand, T., et al., *Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(7): p. 1167-74.
68. Kuemmerle, J.M., et al., *Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep*. J Craniomaxillofac Surg, 2005. **33**(1): p. 37-44.
69. Theiss, F., et al., *Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement*. Biomaterials, 2005. **26**(21): p. 4383-94.
70. Stadlinger, B., et al., *Biomechanical evaluation of a titanium implant surface conditioned by a hydroxide ion solution*. Br J Oral Maxillofac Surg, 2012. **50**(1): p. 74-9.
71. Dvorak, G., et al., *Impact of dietary vitamin D on osseointegration in the ovariectomized rat*. Clinical oral implants research, 2012. **23**(11): p. 1308-13.
72. Bourque, S.L., et al., *Comparison of buprenorphine and meloxicam for postsurgical analgesia in rats: effects on body weight, locomotor activity, and hemodynamic parameters*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010. **49**(5): p. 617-22.
73. Allen, D.L., et al., *Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(5): p. E918-27.
74. Albrektsson, T., et al., *Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man*. Acta Orthop Scand, 1981. **52**(2): p. 155-70.
75. Bindhu, P., et al., *Facts in artifacts*. J Oral Maxillofac Pathol, 2013. **17**(3): p. 397-401.
76. Rastogi, V., et al., *Artefacts: a diagnostic dilemma - a review*. J Clin Diagn Res, 2013. **7**(10): p. 2408-13.
77. Jelliffe, R.W., et al., *Adaptive control of drug dosage regimens: basic foundations, relevant issues, and clinical examples*. Int J Biomed Comput, 1994. **36**(1-2): p. 1-23.
78. Crews, K.R., et al., *Pharmacogenomics and individualized medicine: translating science into practice*. Clin Pharmacol Ther, 2012. **92**(4): p. 467-75.
79. Cao, X., et al., *Pharmacokinetics of PEGylated Recombinant Human Erythropoietin in Rats*. J Anal Methods Chem, 2014. **2014**: p. 918686.

Abkürzungsverzeichnis

ActRIIB-AK	Zu testendes Medikament (ActRIIB-Fc)
μCT	Mikro- Computer Tomographie
BIC	bone- implant-contakt
3T	3 Injektionen ACTRIIB-AK
5T	5 Injektionen ACTRIIB-AK
5P	5 Injektionen Placebo
FDA	Food and drug Administration
PTH	Parathyroidhormon
TGF	Transforming Growth Factor
Act RIIA/B	Aktivinrezeptor II A/B
ActRIIA/B-Fc	Aktivinrezeptor II A/B-Fusionsprotein
ECD	extrazelluläre Domäne
OCL	Osteoklasten-ähnliche Zellen
mg	Milligramm
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
IVC	individually ventilated cages
mM	Millimol
(w/v)	Massenprozent/Volumenprozent
μm	Micrometer
mm	Millimeter
NaOH	Natriumhydroxid
PEEK	Polyetheretherketon
min	Minute
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
g	mittlere Erdbeschleunigung
g	Gramm
ROI	Region of interest
TV	Volume of interst
BV/TV	Trabecular bone volume density
BS/TV	Trabecular bone surface density
BS/BV	Specific bone surface
Tb.Th	Trabecular Thicknes
Tb.Sp	Trabecular Separation
Tb.N	Trabecular Number
DA	Degree of Anisotrophy

SMI	Structure Model index
Conn.D	Trabecular Connectivity
n	Anzahl
MMA	Methylmethacrylat
PMMA	Polymethylmethacrylat
°C	Grad Celsius
ETH	Eidgenössisch technische Hochschule
°/s	Grad per Sekunde
°	Grad
Nmm	Newtonmillimeter
Nmm/°	Newtonmillimeter per Grad
p	p-Wert, Signifikanzwert
OP	Operation
No.	Nummer
BZL	Biologisches Zentrallabor
σ	Filtergrösse
Tab.	Tabelle
Abb.	Abbildung

6 Anhang

6.1 Tabellen

Tab. 5: Körpergewicht Ratten 28.01-28.10

	Wägung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Tier	Datum Code	19.2.2013	7.3.2013	12.3.2013	18.3.2013	25.3.2013	2.4. 2013
28.01	5T	363	462	485	506	521	530
28.02	5T	312	394	401	430	467	491
28.03	5T	323	402	409	435	466	486
28.04	5T	327	394	402	437	457	464
28.05	5T	323	370	419	410	435	459
28.06	5T	336	420	374	451	470	475
28.07	5T	370	451	410	488	520	543
28.08	5T	331	404	402	439	448	452
28.09	5T	342	415	414	455	477	473
28.10	5T	331	397	382	433	475	497

5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, Wägung: Nummer der Wägung, Datum: Datum der Wägung

Tab. 6: Körpergewicht Ratten 28.11-28.20

	Wägung.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Tier	Datum Code	19.2.2013	6.3.2013	12.3.2013	18.3.2013	25.3.2013	2.4.2013
28.11	3T	325	395	370	403	440	477
28.12	3T	342	408	389	433	452	486
28.13	3T	350	420	399	440	480	497
28.14	3T	328	412	385	416	463	501
28.15	3T	326	401	383	422	465	490
28.16	3T	314	401	380	408	445	475
28.17	3T	317	390	375	393	425	458
28.18	3T	344	427	419	443	484	521
28.19	3T	324	399	378	413	448	481
28.20	3T	301	381	358	393	430	451

3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, Wägung: Nummer der Wägung, Datum: Datum der Wägung

Tab. 7: Körpergewicht Ratten 28.21-28.30

	Wägung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Tier	Datum Code	19.2. 2013	12.3.2013	18.3.2013	25.3.2013	2.4.2013	9.4.2013
28.21	5P	329	405	392	419	435	437
28.22	5P	321	413	393	408	423	444
28.23	5P	340	410	398	420	442	451
28.24	5P	336	424	408	425	443	463
28.25	5P	321	400	380	401	412	422
28.26	5P	306	380	357	383	396	402
28.27	5P	333	390	413	438	443	450
28.28	5P	315	365	356	379	398	406
28.29	5P	313	360	336	355	369	372
28.30	5P	308	349	353	381	398	412

5P: 5 Injektionen Placebo, Wägung: Nummer der Wägung, Datum: Datum der Wägung

Tab. 8: Körpergewicht Ratten 28.31-28.40

	Wägung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Tier	Datum Code	10.4.2013	17.4.2013	24.4.2013	1.5.2013	8.5.2013	15.5.2013
28.31	5T	348	380	405	453	470	505
28.32	5T	361	395	429	468	495	534
28.33	5T	358	385	423	462	482	513
28.34	5T	351	370	408	447	463	493
28.35	5T	369	410	442	482	506	525
28.36	5T	349	370	400	434	454	480
28.37	5T	346	364	393	422	445	466
28.38	5T	359	381	400	448	476	502
28.39	5T	355	384	394	435	456	471
28.40	5T	359	371	388	432	460	476

5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, Wägung: Nummer der Wägung, Datum: Datum der Wägung

Tab. 9: Körpergewicht Ratten 28.41-28.50

	Wägung	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Tier	Datum Code	10.4.2013	24.4.2013	1.5.2013	8.5.2013	15.5.2013	22.5. 2013
28.41	5P	340	385	390	410	430	431
28.42	5P	347	396	398	415	429	430
28.43	5P	356	401	401	410	420	436
28.44	5P	343	402	400	418	432	443
28.45	5P	340	377	368	382	394	402
28.46	5P	349	380	387	398	412	418
28.47	5P	354	397	394	418	434	444
28.48	5P	360	394	392	409	417	430
28.49	5P	363	401	402	412	425	438
28.50	5P	349	384	384	396	416	422

5P: 5 Injektionen Placebo, Wägung: Nummer der Wägung, Datum: Datum der Wägung

Tab. 10: Körpergewicht Ratten 28.51-28.60

	Wägung.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Tier	Datum Code	17.4.2013	29.4.2013	8.5.2013	15.5.2013	20.5.2013	27.5.2013
28.51	3T	348	385	389	396	420	450
28.52	3T	352	399	414	442	460	482
28.53	3T	349	382	389	410	425	448
28.54	3T	351	391	405	425	446	466
28.55	3T	342	370	376	400	414	437
28.56	3T	330	348	348	365	382	417
28.57	3T	340	375	385	407	432	478
28.58	3T	350	374	378	394	420	455
28.59	3T	337	360	+	+	+	+
28.60	3T	351	378	385	405	428	451

+: Ratte verstorben, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, Wägung: Nummer der Wägung,
Datum: Datum der Wägung

Tab. 11: Körpergewicht Ratten 28.61- 28.62

Tier	Wägung	1.	2.	3.			
	Datum Code	15.5. 2013	28.5. 2013	6.6. 2013	11.6. 2013	18.6. 2013	25.6. 2013
28.61	3T	276	318	326	331	367	394
28.62	3T	276	304	318	322	364	387

3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, Wägung.: Nummer der Wägung, Datum: Datum der Wägung

Tab. 12: Körpergewichtszunahme der Ratten während der Lebendphase

Code: 5T		Code: 3T		Code: 5P	
Tier	Gewichtszunahme (g)	Tier	Gewichtszunahme (g)	Tier	Gewichtszunahme (g)
28.01	167	28.11	152	28.21	108
28.02	179	28.12	144	28.22	123
28.03	163	28.13	147	28.23	111
28.04	137	28.14	173	28.24	127
28.05	136	28.15	164	28.25	101
28.06	139	28.16	161	28.26	96
28.07	173	28.17	141	28.27	117
28.08	121	28.18	177	28.28	91
28.09	131	28.19	157	28.29	59
28.10	166	28.20	150	28.30	104
28.31	157	28.51	102	28.41	91
28.32	173	28.52	130	28.42	83
28.33	155	28.53	99	28.43	80
28.34	142	28.54	115	28.44	100
28.35	156	28.55	95	28.45	62
28.36	131	28.56	87	28.46	69
28.37	120	28.57	138	28.47	90
28.38	143	28.58	105	28.48	70
28.39	116	28.60	100	28.49	75
28.40	117	28.61	118	28.50	73
		28.62	111		
Mean:	146.10±20.16*		131.71±27.81*		91.5±20.01*

Gewichtszunahme: Unterschied zwischen Körpergewicht bei Ankunft und Euthanasie.

5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, 5P: 5 Injektionen Placebo

*p<0.05 for 5T/3T verglichen zu 5P

Tab. 13: Klinische Befunde nach der Operation

Tier	Code	Klinische Befunde
28.01	5T	Keine Befunde
28.02	5T	Keine Befunde
28.03	5T	18.3.2013: Geringgradige Wundschwellung, 19.3.2013: Reduzierte Wundschwellung, 20.3.2013: Keine Wundschwellung
28.04	5T	18.3.2013: Geringgradige Wundschwellung, 19.3.2013-24.3.2013: Unveränderte Wundschwellung, 25.3.2013: Schwellung zurückgegangen, 26.3.2013: Keine Schwellung mehr
28.05	5T	Keine Befunde
28.06	5T	Keine Befunde
28.07	5T	10.3.2013: Geringgradige Sekretion, 12.3.2013: Geringgradige Nahtdehiszenz, Implantat bedeckt, 13.3.2013: Wunde in Granulation, 16.3.2013: Wunde geheilt
28.08	5T	10.3.2013: Geringgradige Sekretion, 12.3.2013: Geringgradige Nahtdehiszenz, Implantat bedeckt, 13.3.2013: Wunde in Granulation, 16.3.2013: Wunde geheilt
28.09	5T	Keine Befunde
28.10	5T	Keine Befunde
28.11	3T	18.3.2013 Bisswunde im Nacken in Granulation, 20.3.2013: Wunde geheilt
28.12	3T	Keine Befunde
28.13	3T	Keine Befunde
28.14	3T	10.3.2013: Nahtdehiszenz, Implantat bedeckt, 13.3.2013: Wunde geheilt
28.15	3T	Keine Befunde
28.16	3T	20.3.2013: Bisswunde im Nacken in Granulation, 22.3.2013: Wunde geheilt
28.17	3T	18.3.2013: Geringgradige Wundschwellung, 19.3.2013-26.3.2013: Geringgradige, lokalisierte Wundschwellung, 27.3.2013: Keine Schwellung mehr
28.18	3T	Keine Befunde
28.19	3T	Keine Befunde
28.20	3T	8.3.2013: Teilweise Nahtdehiszenz, Implantat bedeckt. 10.3.2013: Noch kleine Wunde offen, 12.3.2013: Wunde geheilt.

Tier	Code	Klinische Befunde
28.21	5P	Keine Befunde
28.22	5P	18.3.2013: Geringgradige Nahtdehiszenz, Implantat bedeckt, 21.3.2013: Wunde geheilt
28.23	5P	15.3.2013: Bisswunde in Granulation, 17.3.2013: Wunde geheilt.
28.24	5P	Keine Befunde
28.25	5P	Keine Befunde
28.26	5P	18.3.2013: Geringgradige Nahtdehiszenz, Implantat bedeckt, 21.3.2013: Wunde geheilt
28.27	5P	17.3.2013: Bisswunde im Nacken, 18.3.2013: Wunde in Granulation, 25.3.2013 Wunde in Heilung, 27.3.2013: Wunde geheilt
28.28	5P	Keine Befunde
28.29	5P	Keine Befunde
28.30	5P	Keine Befunde
28.31	5T	Keine Befunde
28.32	5T	Keine Befunde
28.33	5T	Keine Befunde
28.34	5T	Keine Befunde
28.35	5T	Keine Befunde
28.36	5T	Keine Befunde
28.37	5T	Keine Befunde
28.38	5T	Keine Befunde
28.39	5T	Keine Befunde
28.40	5T	Keine Befunde
28.41	5P	Keine Befunde
28.42	5P	Keine Befunde
28.43	5P	Keine Befunde
28.44	5P	Keine Befunde
28.45	5P	Keine Befunde
28.46	5P	Keine Befunde
28.47	5P	Keine Befunde
28.48	5P	Keine Befunde
28.49	5P	Keine Befunde
28.50	5P	Keine Befunde

Tier	Code	Klinische Befunde
28.51	3T	Keine Befunde
28.52	3T	Keine Befunde
28.53	3T	Keine Befunde
28.54	3T	Keine Befunde
28.55	3T	Keine Befunde
28.56	3T	Keine Befunde
28.57	3T	Keine Befunde
28.58	3T	Keine Befunde
28.59	3T	Ratte verstorben
28.60	3T	Keine Befunde
28.61	3T	Keine Befunde
28.62	3T	Keine Befunde

5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, 5P: 5 Injektionen Placebo

Tab. 14 : Evaluation der Röntgenbilder post mortem (Knochen)

Tier	Code	Evaluation der Röntgenbilder (bone) post mortem		
		Resorption	Sklerose	Implantat/Knochen Befunde
28.01	5T	0	0	Keine Befunde
28.02	5T	0	0	Keine Befunde
28.03	5T	0	0	Keine Befunde
28.04	5T	0	0	Periostale Knochenanlagerung nahe der
28.05	5T	0	0	Keine Befunde
28.06	5T	0	0	Keine Befunde
28.07	5T	0	0	Kallus um Schraube und distal der Schraube
28.08	5T	0	0	Kallus an cis- und trans-Kortex
28.09	5T	0	0	Kallus distal der Schraube
28.10	5T	0	0	Keine Befunde
28.11	3T	0	0	Keine Befunde
28.12	3T	0	0	Grosser Kallus um Schraubenkopf
28.13	3T	0	0	Periostaler Kallus distal der Schraube
28.14	3T	0	0	Keine Befunde
28.15	3T	0	0	Keine Befunde
28.16	3T	0	0	Keine Befunde
28.17	3T	0	0	mittelgrosser Kallus um Schraubenkopf
28.18	3T	0	0	Schraube nicht komplett im Knochen,
28.19	3T	0	0	Keine Befunde
28.20	3T	0	0	Keine Befunde
28.21	5P	0	0	Kleiner Kallus um die Schraube
28.22	5P	0	0	Keine Befunde
28.23	5P	0	0	Keine Befunde
28.24	5P	0	0	Keine Befunde
28.25	5P	0	0	Keine Befunde
28.26	5P	0	0	Kleiner Kallus proximal der Schraube
28.27	5P	0	0	Keine Befunde
28.28	5P	0	0	Schraube schräg
28.29	5P	0	0	Kleiner Kallus proximal der Schraube
28.30	5P	0	0	Keine Befunde
28.31	5T	0	0	Kleiner Kallus
28.32	5T	0	0	Keine Befunde
28.33	5T	0	0	Verdickung der Kortikalis
28.34	5T	0	0	Keine Befunde

Tier	Code	Evaluation der Röntgenbilder (bone) post mortem		
28.35	5T	0	0	Implantat nicht komplett im Knochen
28.36	5T	0	0	Implantat nicht komplett im Knochen
28.37	5T	0	0	Keine Befunde
28.38	5T	0	0	Keine Befunde
28.39	5T	0	0	Schraube schräg, nicht komplett im Knochen
28.40	5T	0	0	Schraube schräg, nicht komplett im Knochen
28.41	5P	0	0	Keine Befunde
28.42	5P	0	0	Keine Befunde
28.43	5P	0	0	Keine Befunde
28.44	5P	0	0	Keine Befunde
28.45	5P	0	0	Keine Befunde
28.46	5P	0	0	Keine Befunde
28.47	5P	0	0	Schraube schräg
28.48	5P	0	0	Kallus distal der Schraube
28.49	5P	0	0	Keine Befunde
28.50	5P	0	0	Keine Befunde
28.51	3T	0	0	Keine Befunde
28.52	3T	0	0	Keine Befunde
28.53	3T	0	0	Schraube schräg
28.54	3T	0	0	Keine Befunde
28.55	3T	0	0	Keine Befunde
28.56	3T	0	0	Keine Befunde
28.57	3T	0	0	Keine Befunde
28.58	3T	0	0	Keine Befunde
28.59*	3T	n/a	n/a	n/a
28.60	3T	0	0	Kleiner Kallus proximal der Schraube
28.61	3T	0	0	Keine Befunde
28.62	3T	0	0	Keine Befunde

5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, 5P: 5 Injektionen Placebo

* Tier verstorben, cis Kortex: Kortex nah dem Schraubenkopf , trans-Kortex: fren dem Schraubenkopf

Tab. 15 Mikroradiographische Evaluation der Dickschnitte

Tier	Code	Evaluation der Mikroradiographien post mortem		
		Resorption	Sklerose	Implantat/Knochen Befunde
28.01	5T	0	0	-
28.02	5T	0	0	Fraktur post mortem
28.03	5T	0	0	Fraktur post mortem
28.04	5T	0	0	-
28.05	5T	0	0	-
28.06	5T	0	0	-
28.07	5T	0	0	-
28.08	5T	0	0	Mittelgrosser Kallus
28.09	5T	0	0	Kleiner Kallus
28.10	5T	0	0	Kleiner Kallus
28.11	3T	0	0	Fraktur post mortem
28.12	3T	0	0	Mittelgrosser Kallus
28.13	3T	0	0	Fissur post mortem, mittelgrosser Kallus
28.14	3T	0	0	-
28.15	3T	0	0	Kleiner Kallus
28.16	3T	0	0	-
28.17	3T	0	0	Grosser Kallus
28.18	3T	0	0	Implantat nicht komplett im Knochen,
28.19	3T	0	0	Kleiner Kallus
28.20	3T	0	0	-
28.21	5P	0	0	Mittelgrosser Kallus, Fraktur post mortem
28.22	5P	0	0	Mittelgrosser Kallus
28.23	5P	0	0	-
28.24	5P	0	0	Kleiner Kallus
28.25	5P	0	0	Fraktur post mortem
28.26	5P	0	0	-
28.27	5P	0	0	-
28.28	5P	0	0	Mittelgrosser Kallus, Fraktur post mortem
28.29	5P	0	0	Mittelgrosser Kallus
28.30	5P	0	0	Mittelgrosser Kallus

5T: 5 Injektion ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, 5P: 5 Injektionen Placebo, -: keine Befunde

Tab. 16: Ergebnisse der qualitativen Evaluation der Dickschnitte

Tier	Code	rechts				links			
		Pl	MNGC	Mac	Ly	Pl	MNGC	Mac	Ly
28.01	5T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.02	5T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.03	5T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.04	5T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.05	5T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.06	5T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.07	5T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.08	5T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.09	5T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.10	5T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.11	3T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.12	3T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.13	3T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.14	3T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.15	3T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.16	3T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.17	3T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.18	3T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.19	3T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.20	3T	0	0	0	0	0	0	0	0
28.21	5P	0	0	0	0	0	0	0	0
28.22	5P	0	0	0	0	0	0	0	0
28.23	5P	0	0	0	0	0	0	0	0
28.24	5P	0	0	0	0	0	0	0	0
28.25	5P	0	0	0	0	0	0	0	0
28.26	5P	0	0	0	0	0	0	0	0
28.27	5P	0	0	0	0	0	0	0	0
28.28	5P	0	0	0	0	0	0	0	0
28.29	5P	0	0	0	0	0	0	0	0
28.30	5P	0	0	0	0	0	0	0	0

Pl: Plasmazellen, MNGC: mehrkernige Riesenzellen, Ly: Lymphozyten, Mac; Makrophagen

Right/left: Zwei Seiten der Schraube, ein Evaluationsareal auf jeder Seite 5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, 5P: 5 Injektionen Placebo

Tab. 17: Ergebnisse der biomechanischen Testung

Tier	Code	Biomechanische Testung		
		Interfacial	Removal Torque	Yield torque (Nmm)
28.31	5T	49.13	104.26	103.66
28.32	5T	40.93	91.57	89.20
28.33	5T	37.36	121.90	120.70
28.34	5T	51.86	130.01	129.22
28.35	5T	34.16	86.39	86.22
28.36	5T	31.11	85.18	84.59
28.37	5T	28.90	95.00	92.90
28.38	5T	28.98	80.57	79.14
28.39	5T	43.57	94.55	93.67
28.40	5T	40.48	85.18	84.19
28.41	5P	32.64	93.45	91.42
28.42	5P	21.49	83.92	80.90
28.43	5P	44.66	110.27	109.88
28.44	5P	32.23	86.32	84.73
28.45	5P	28.73	81.95	80.88
28.46	5P	40.35	102.35	101.86
28.47	5P	39.70	76.68	74.23
28.48	5P	34.42	86.52	84.18
28.49	5P	70.09	120.83	111.18
28.50	5P	32.30	73.56	72.66
28.51	3T	24.51	101.08	97.50
28.52	3T	42.92	102.00	101.51
28.54	3T	31.94	80.56	79.22
28.55	3T	33.68	72.59	71.27
28.56	3T	43.33	117.89	112.79
28.57	3T	27.82	89.91	89.32
28.58	3T	19.31	90.58	86.01
28.60	3T	40.07	97.20	96.17
28.61	3T	45.99	93.42	92.39
28.62	3T	30.99	107.56	104.35

5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, 5P: 5 Injektionen Placebo)

Tab. 18 Ergebnisse der Histomorphometrie: Bone-Implant-Contact (BIC)

Tier	Code	Gesamt	Gesamt	BIC	BIC	%	%	Mittel
28.01	5T	1310.35	900.24	1150.22	579.13	0.88	0.64	0.76
28.02	5T	1278.84	1314.17	238.9	878.83	0.19	0.67	0.43
28.03	5T	1298.7	1374.92	820.2	1021.28	0.63	0.74	0.69
28.04	5T	1535.6	1379.03	1016.87	930.52	0.66	0.67	0.67
28.05	5T	1229.81	1305.29	888.69	894.59	0.72	0.69	0.70
28.06	5T	1340.44	1436.46	721.3	1082.65	0.54	0.75	0.65
28.07	5T	1426.51	1463.32	829.76	1099.84	0.58	0.75	0.67
28.08	5T	1019.5	1318.94	372.66	687.96	0.37	0.52	0.44
28.09*	5T	n/a*	1261.69	n/a*	522.42	n/a*	0.41	n/a*
28.10	5T	961.09	1520.32	513.99	897.09	0.53	0.59	0.56
28.11	3T	1286.83	1210.39	793.81	756.16	0.62	0.62	0.62
28.12	3T	1490.38	1214.43	1287.93	860.15	0.86	0.71	0.79
28.13	3T	1096.09	978.23	909.08	731.06	0.83	0.75	0.79
28.14	3T	1286.58	1571.45	453.31	1368.23	0.35	0.87	0.61
28.15	3T	1118.3	1296.9	596.99	882.51	0.53	0.68	0.61
28.16	3T	1490.98	1406.13	1482.38	1138.01	0.99	0.81	0.90
28.17	3T	1564.58	1385.76	845.15	945.88	0.54	0.68	0.61
28.18	3T	1459.72	1202.65	528.58	1190.3	0.36	0.99	0.68
28.19	3T	1389.28	1368.71	1197.51	783.98	0.86	0.57	0.72
28.20	3T	1236.83	1479.39	752.14	1317.43	0.61	0.89	0.75
28.21	5P	1087.06	1035.48	624.06	852.68	0.57	0.82	0.70
28.22	5P	1268.15	1033.9	934.66	393.79	0.74	0.38	0.56
28.23	5P	1142.85	1449.03	853.11	1246.92	0.75	0.86	0.80
28.24	5P	1312.59	1252.68	1067.72	934.91	0.81	0.75	0.78
28.25	5P	1504.02	1236.35	899.95	829.7	0.60	0.67	0.63
28.26	5P	1164.77	1304.91	951.97	1079.74	0.82	0.83	0.82
28.27	5P	1516.79	1325.72	1389.35	1214.92	0.92	0.92	0.92
28.28	5P	1315.82	1083.05	1043.19	599.95	0.79	0.55	0.67
28.29	5P	1242.64	1355.66	708.25	1206.76	0.57	0.89	0.73
28.30	5P	1057.33	1419.56	576.22	1207.71	0.54	0.85	0.70

*linke Schraubenseite von Statistik ausgeschlossen, da die zu untersuchende Region nicht klar definierbar, 5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, 5P: 5 Injektionen Placebo

Tab. 19: Serumkonzentration ActRIIB-AK

Tier	Code	mg/kg ActRIIB-AK	Tier	Code3	mg/kg ActRIIB-AK
28.01	5T	318	28.31	5T	1090
28.02	5T	825	28.32	5T	1400
28.03	5T	809	28.33	5T	1230
28.04	5T	869	28.34	5T	1680
28.05	5T	970	28.35	5T	1390
28.06	5T	757	28.36	5T	1190
28.07	5T	1260	28.37	5T	1550
28.08	5T	892	28.38	5T	1070
28.09	5T	108	28.39	5T	937
28.10	5T	1000	28.40	5T	1120
28.11	3T	633	28.41	5P	BLQ
28.12	3T	530	28.42	5P	BLQ
28.13	3T	718	28.43	5P	BLQ
28.14	3T	545	28.44	5P	BLQ
28.15	3T	856	28.45	5P	BLQ
28.16	3T	1010	28.46	5P	BLQ
28.17	3T	634	28.47	5P	BLQ
28.18	3T	945	28.48	5P	BLQ
28.19	3T	789	28.49	5P	BLQ
28.20	3T	420	28.50	5P	BLQ
28.21	5P	BLQ	28.51	3T	1170
28.22	5P	BLQ	28.52	3T	555
28.23	5P	BLQ	28.53	3T	1190
28.24	5P	BLQ	28.54	3T	996
28.25	5P	BLQ	28.55	3T	749
28.26	5P	BLQ	28.56	3T	662
28.27	5P	BLQ	28.57	3T	964
28.28	5P	BLQ	28.58	3T	909
28.29	5P	BLQ	28.60	3T	1050
28.30	5P	BLQ	28.61	3T	1040
			28.62	3T	1570

5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, 5P: 5 Injektionen Placebo, BLQ: Serumwert unter Messgrenze

6.2 Abbildungen

6.2.1 Körpergewicht

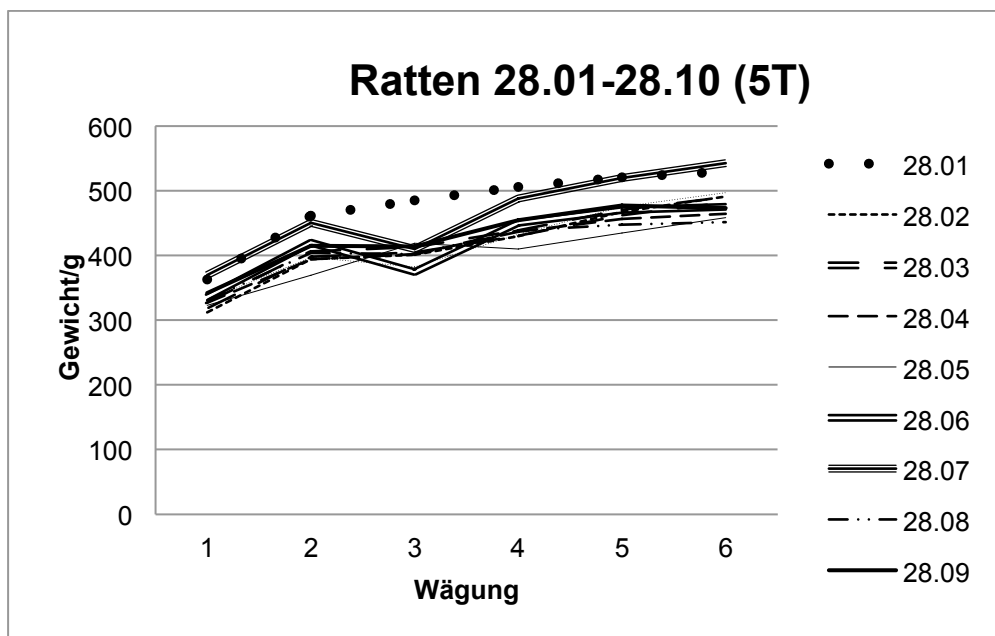


Abb. 10: Körpergewicht Ratten 28.01-28.10 (Behandlung: 5 Injektionen ActRIIB-AK)

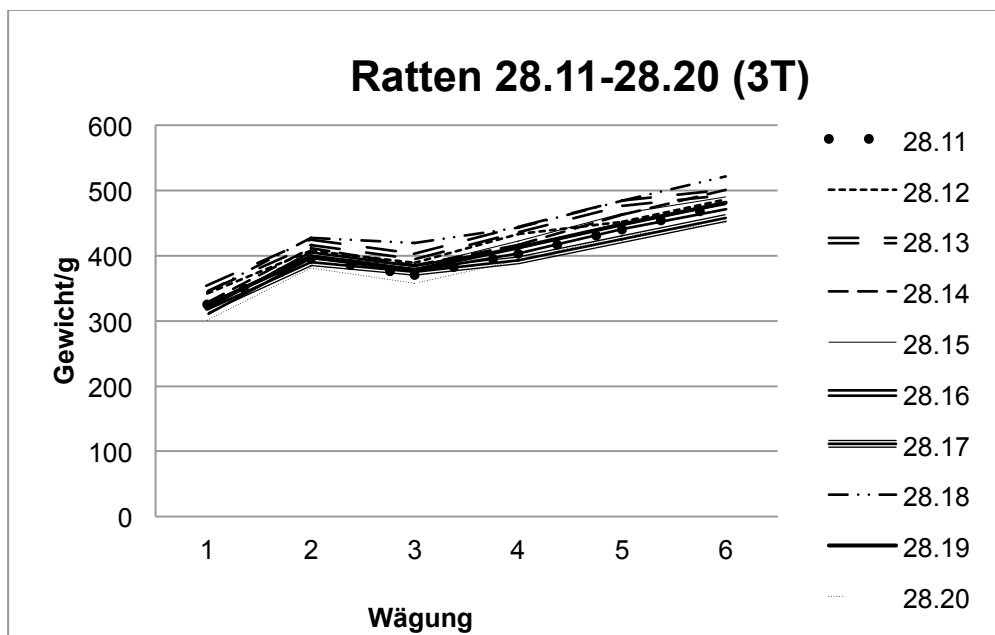


Abb. 11: Körpergewicht Ratten 28.11-28.20 (Behandlung: 3 Injektionen ActRIIB-AK)

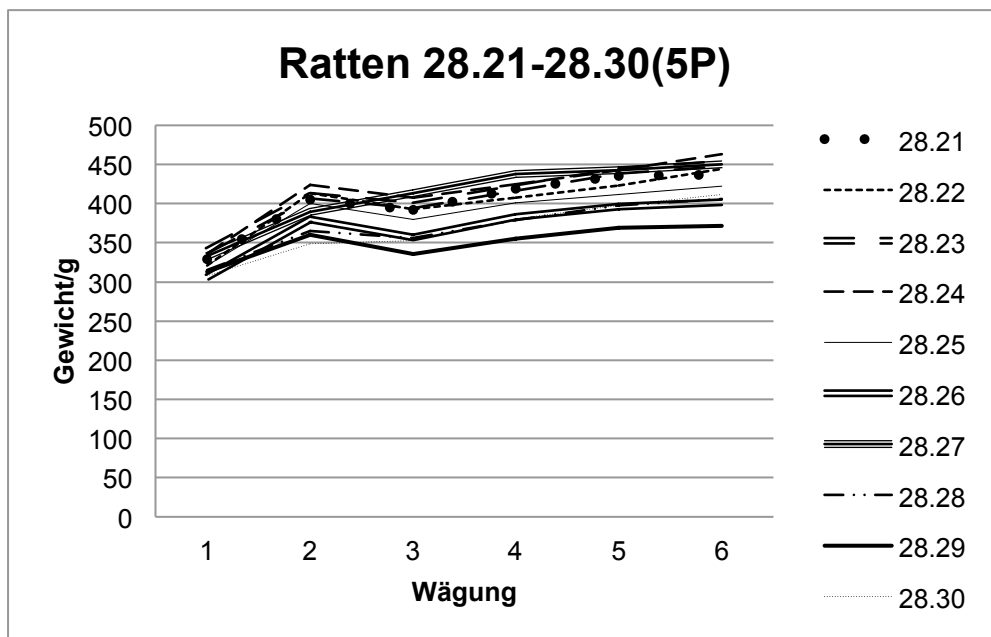


Abb. 12: Körpergewicht Ratten 28.21-28.30 (Behandlung: 5 Injektionen Placebo)

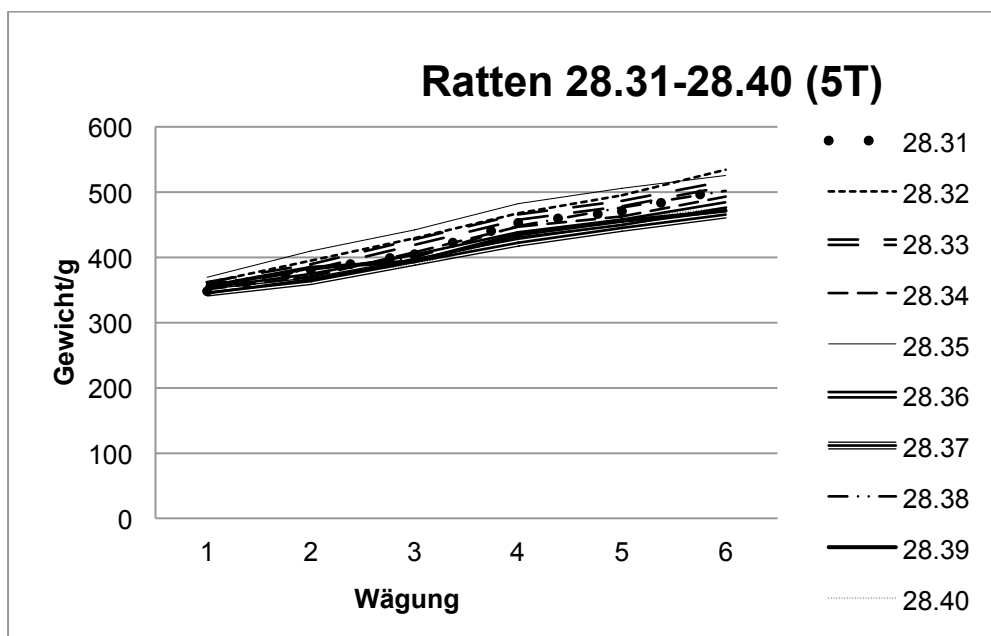


Abb. 13: Körpergewicht Ratten 28.31-28.40 (Behandlung: 5 Injektionen ActRIIB-AK)

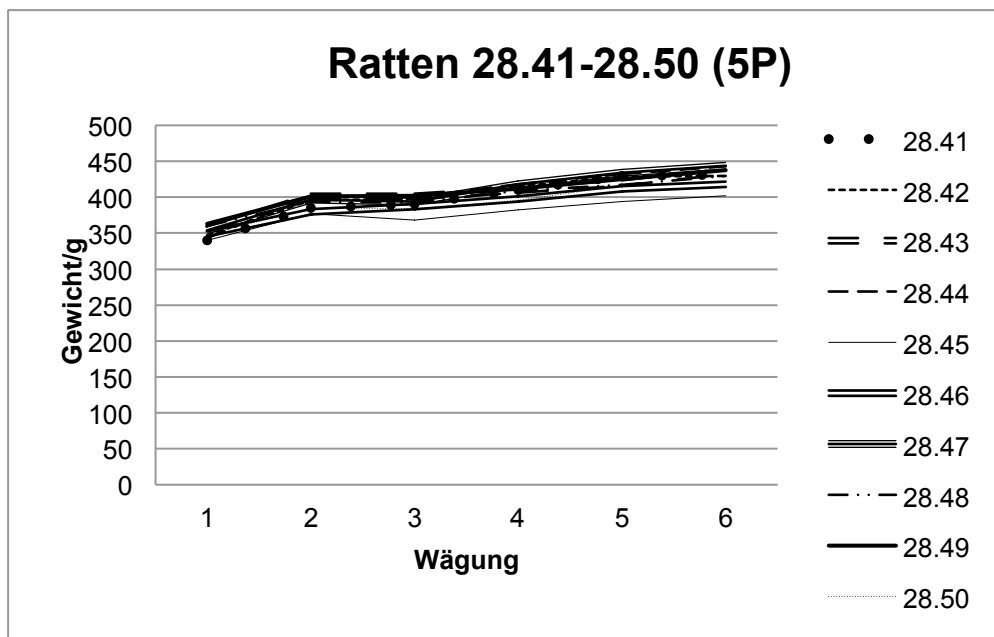


Abb. 14: Körpergewicht Ratten 28.41-28.50 (Behandlung: 5 Injektionen Placebo)

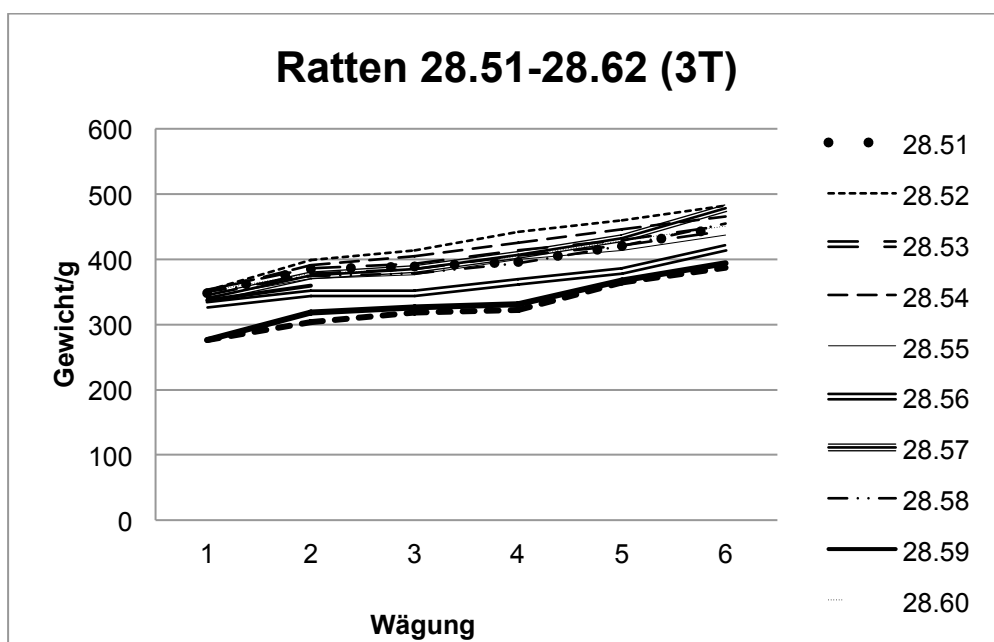


Abb. 15: Körpergewicht Ratten 28.51-28.60 (Behandlung: 3 Injektionen ActRIIB-AK)

6.2.2 Körpergewichtszunahme in der Lebendphase

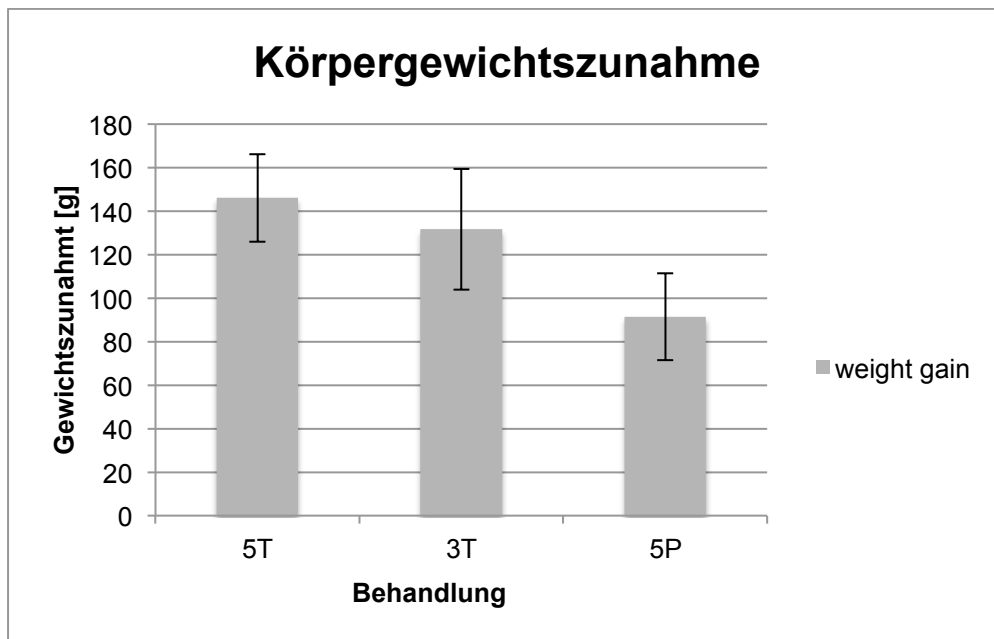


Abb. 16: Körpergewichtszunahme der Ratten während der Lebendphase
 5T: 5 Injektionen ActRIIB-AK, 3T: 3 Injektionen ActRIIB-AK, 5P: 5 Injektionen Placebo

6.2.3 BIC-Beispiel

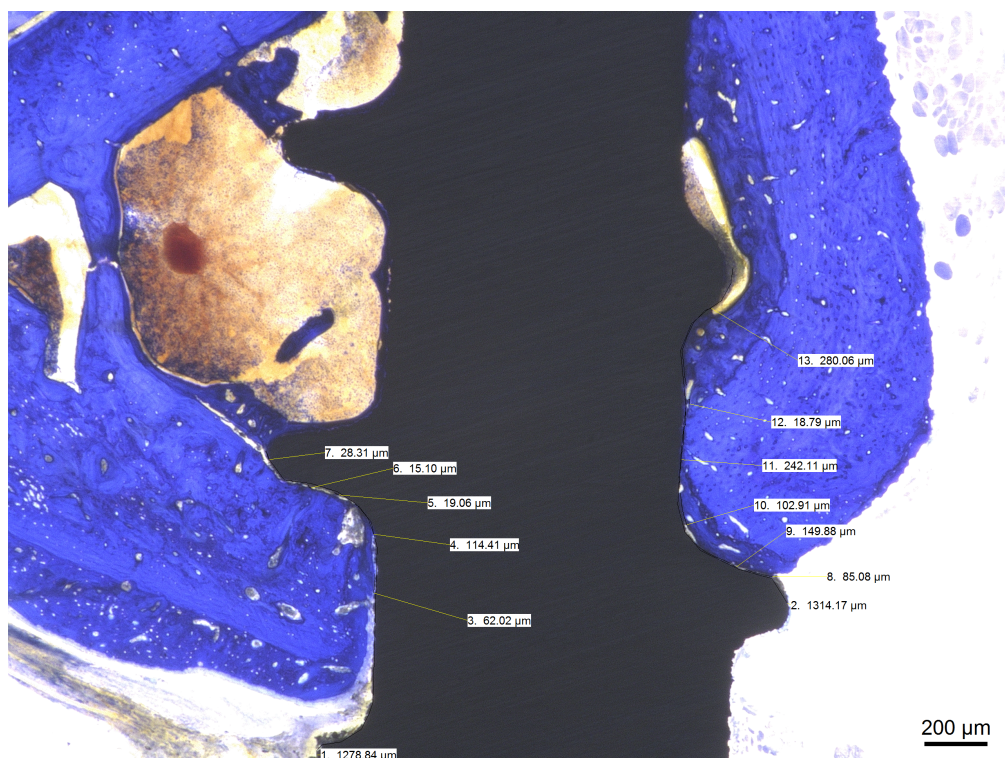


Abb. 17: Beispiel für eine BIC Messung

Danksagung

Als erstes möchte ich Brigitte von Rechenberg danken. Speziell für ihr positives und starkes Wesen, womit sie es stets schaffte mich zu motivieren und zu unterstützen. Stephen Ferguson für das Übernehmen des Korreferats und die Leitung der Biomechanik. Ebenso danke ich Katja Nuss für die gute Betreuung und vor allem für ihr Verständnis und ihren Rat in allen Lebenslagen. Desweiteren möchte ich mich bei meinem Projektpartner für die Zusammenarbeit bedanken.

Weiterhin möchte mich bedanken bei:

Der Firma Thommen Medical für das Bereitstellen der Implantate und des Equipments. Kurt Bösiger vom Physikinstitut für das Herstellen der Beinhalterung Remo Affentranger für die Biomechanik und seine Beratung

Scanco Medical für die Durchführung der μ CT-Analyse. Dem BZL Team für die Zusammenarbeit, vor allem bei Flora Nicholls und Thea Fleischmann. Aga Karol für Ihre Hilfe und für ihre sonnige Art. Käthi Kämpf, Kati Zlinski, Sabina Wundelin und Ladina Ettinger für ihre Arbeit im Labor. Beim gesamten MSRU Team Karina Klein, Flurina Clement-Frey, Sabine Koch, Peter Kronen, Stefan Stübinger, Rainer Egle, Valentin Reichle, Lena Müller, Svende Pfundstein, Nadja Saddedine, Jola Plihal, Alexandra Grob, Michael Künzle, Salim Darwiche, Julia Freudenhammer, Sophie Schöberl, Silvana Ressegatti und Familie Knüsel für die tolle Zeit zusammen. Anika Drechsler für Ihre Unterstützung, ihre Offenheit und besonders für ihre Freundschaft. Ramon Bucher für seine Hilfe und seine immer etwas andere Sicht der Dinge. Mario Benn für seinen Humor und sein Verständnis. Danke auch an die Tierklinik Arz, besonders Guido Arz und Janina Nachtwey. Ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern, Dagmar Frieese-Stempel und Manfred Stempel, meinen Schwerstern Judith und Katrin, Martin Betz und meiner Omi Barbara Frieese aussprechen. Danke für alles, was ich von Euch gelernt habe.

Zum Schluss danke ich meinem Mann Christian Estelmann für seine Geduld und seine Grosszügigkeit.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Maren Stempel-Estelmann
Geburtsdatum	11. September 1984
Geburtsort	Bad Bergzabern
Nationalität:	deutsch

Schulbildung

03/04	Abitur
1995 – 2004	Max-Slevogt-Gymnasium, Landau i.d. Pfalz

Studium und beruflicher Werdegang

Seit 05/14	Assistentztierärztin in der Tierklinik Arz Saarbrücken
01/13-04/14	Mitarbeit an der Musculoskeletal Research Unit (MSRU) Dissertation bei Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Departement für Pferde, Vetsuisse Fakultät Universität Zürich, MSRU
05/10-12/12	Assistentztierärztin, Tierklinik Arz Saarbrücken
2010	3. Staatsexamen
01/07-12/08	Studentische Hilfskraft, Chirurgische Tierklinik Leipzig
10/04	Immatrikulation an der Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät
